



Eco-purification de produits naturels par CPC : changement d'échelle et solvants alternatifs

Elodie Bouju

► To cite this version:

Elodie Bouju. Eco-purification de produits naturels par CPC: changement d'échelle et solvants alternatifs. Chimie analytique. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. NNT: 2015LYO10220 . tel-01281441

HAL Id: tel-01281441

<https://theses.hal.science/tel-01281441>

Submitted on 2 Mar 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre : 220-2015

Année 2015

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE DE CHIMIE

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 18 novembre 2015

par

Elodie BOUJU

TITRE :

**Eco-purification de produits naturels par CPC :
changement d'échelle et solvants alternatifs**

Directrice de thèse : Mme Karine FAURE

JURY :	Mme Laurence MUHR	Rapporteur
	M. Pierre WAFFO-TEGUO	Rapporteur
	M. Hervé CASABIANCA	Examineur
	M. Gilles COMTE	Examineur
	M. Jean-Luc WOLFENDER	Examineur
	Mme Karine FAURE	Directrice de thèse
	M. Alain BERTHOD	Invité

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. François-Noël GILLY

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Directeur Général des Services

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme Caroline FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements

Mes remerciements s'adressent en premier lieu à ma directrice de thèse, Madame Karine Faure, pour la confiance qu'elle a su m'accorder, mais aussi pour son éternel soutien et les très nombreux conseils qu'elle a pu me prodiguer. Merci de m'avoir permis de vivre trois années de thèse aussi enrichissantes qu'agréables.

J'exprime également toute ma gratitude envers Monsieur Alain Berthod, pour avoir bien voulu me transmettre une partie de son immense savoir, mais aussi pour son humour et sa bonne humeur au quotidien.

Je souhaiterais également remercier mon jury de thèse, Madame Laurence Muhr et Monsieur Pierre Waffo-Teguo, pour avoir accepté de rapporter ce manuscrit, et Messieurs Hervé Casabianca, Gilles Comte et Jean-Luc Wolfender, pour avoir consenti à examiner mes travaux.

Je remercie la société Rousselet-Robatel et plus particulièrement son directeur, Monsieur Roger Michud, pour m'avoir fait confiance en acceptant de financer ces travaux. Je remercie également Monsieur Jérémie Meucci pour son écoute et sa sympathie.

Un grand merci à mes nombreux collègues doctorants, alternants ou CDD de l'ISA qui ont égayé mon quotidien : Josiane et Audrey avec qui j'ai passé mes 3 ans de thèse, mais aussi Morgan, Ferial, Mathilde, Marion, Céline, Pauline, Amélie C., Amélie d'A. et Racha.

Merci également aux autres membres de l'équipe Chromatographie et Techniques Couplées de l'ISA pour leur sympathie, Sabine Heinisch, Florent Rouvière mais aussi Gérard Crétier pour ses conseils précieux en chromatographie préparative et Magali Batteau pour son aide et sa persévérance, qui m'ont permis de terminer ces travaux en beauté.

Je souhaite remercier les autres membres de l'ISA que j'ai pu côtoyer : David pour sa serviabilité, Gaëtan pour son écoute et Stéphane pour sa sportivité.

Je remercie aussi les différents stagiaires qui ont contribué de près ou de loin aux travaux présentés dans ce manuscrit : Sandra, Julien et Norbert.

J'exprime également toute ma gratitude envers Hervé Delépine pour avoir su cerner mon projet professionnel en m'orientant vers cette thèse.

Je souhaiterais également remercier toute l'équipe Phytochemistry & Bioactive Natural Products and Pharmacognosy de Genève, avec qui j'ai passé deux mois passionnants. Je remercie particulièrement mes encadrants, Muriel Cuendet et Emerson Queiroz-Ferreira pour m'avoir fait confiance et m'avoir appris tant de nouvelles choses dans le domaine des produits naturels. Je remercie également les doctorants avec qui j'ai passé de très nombreux bons moments : Théo, Aymeric, Pierre-Marie, Quentin, Emmanuelle, Paul, Davide, Leonardo, Olivier, Vincent, Sarah, Vera, Nicolas et Joëlle. Merci également à Frédéric Borlat avec qui j'ai pu découvrir la rigueur des tests biologiques et Nathalie Schregle pour son accueil chaleureux dès le premier jour.

Enfin, je souhaiterais remercier ma famille, mes amis et ma belle-famille, pour leur éternel soutien, et je dédie ce manuscrit à Loïc, mon conjoint, qui a suivi l'intégralité de mon parcours dans le supérieur. Un grand merci pour ta patience, ta raison et ta sagesse qui me permettent d'avancer chaque jour.

TITRE en français : Eco-purification de produits naturels par CPC : changement d'échelle et solvants alternatifs

RESUME en français :

L'objectif de cette thèse est de mettre en place des outils permettant l'éco-purification de produits naturels par chromatographie de partage centrifuge (CPC), une technique préparative permettant la séparation de composés grâce à un système solvant constitué de deux liquides non miscibles.

Ce manuscrit expose dans un premier temps une brève présentation des différentes techniques préparatives fréquemment utilisées pour la purification de produits naturels, puis détaille la technique de chromatographie de partage centrifuge. Le concept de chimie verte est alors introduit avant d'exposer la manière dont il sera pris en compte par la suite. Ainsi, un développement de méthode CPC à petite échelle, dans le but de limiter la consommation de solvants et la production de déchets, tout en limitant la consommation d'énergie, est illustré par la purification du carnosol issu du romarin. Par la suite, une nouvelle méthodologie de changement d'échelle en CPC est introduite, afin de pouvoir augmenter de manière efficace la productivité d'une méthode de purification, sans avoir à la redévelopper à grande échelle. L'utilisation de cette méthodologie peut notamment permettre à un utilisateur CPC de réduire considérablement sa consommation de solvants et d'énergie, tout comme sa génération de déchets chimiques. Cette méthodologie de changement d'échelle est appliquée dans le cadre de la purification du carnosol développée en amont. Enfin, la dernière partie de ces travaux est consacrée à la substitution de solvants d'origine pétrolière, par des solvants plus respectueux de l'environnement, principalement d'origine agro-sourcée.

TITRE en anglais : Natural products eco-purification by CPC : scale-up and alternative solvents

RESUME en anglais :

The main objective of this thesis is to propose some clues for natural products eco-purification by centrifugal partition chromatography (CPC), a preparative separation technique that uses a biphasic solvent system.

First, the manuscript describes the different preparative techniques commonly used for natural products purification. Then, the centrifugal partition chromatography technique is detailed. The green chemistry concept is subsequently introduced and discussed in regard to its application in purification process. A method development is realized on a small scale CPC, illustrating the reduction of solvent consumption and waste production, through the carnosol purification from rosemary. Later, a new scale-up methodology for CPC is introduced to efficiently transfer the method on larger instrument and increase production. This new methodology will allow for a CPC user to reduce solvent and energy consumption and chemical wastes discharges. This scale-up methodology is then applied to carnosol purification from a rosemary solid extract. Finally, the last part of this manuscript is devoted to petroleum solvents substitution by more environmentally friendly solvents like bio-sourced solvents.

DISCIPLINE : Chimie Analytique

MOTS-CLES : Chromatographie de partage centrifuge, purification, chimie verte, changement d'échelle, produits naturels, solvants alternatifs, carnosol.

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

Institut des Sciences Analytiques, Université de Lyon, UMR CNRS 5280, 5 rue de la Doua, 69100 Villeurbanne, France.

Glossaire

Arizona M : système biphasique constitué d'heptane, acétate d'éthyle, méthanol, eau en proportions 5/6/5/6 (v/v)

Arizona vert P = système biphasique constitué de limonène, acétate d'éthyle, éthanol, eau en proportions 6/5/6/5 (v/v)

CCC = Chromatographie à Contre-Courant

CPC = Chromatographie de Partage Centrifuge

ΔV = espace disponible entre deux pics chromatographiques

$\Delta V/t$ = espace disponible entre deux pics chromatographiques rapporté à la durée de l'opération

F_{SU} = facteur de changement d'échelle

HPLC = Chromatographie Liquide Haute Performance

K_d = coefficient de partage

S_f = taux de phase stationnaire

t_G = temps de gradient

t_{palier} = temps de palier

V_c = volume colonne

V_M = volume mort ou volume de phase mobile

V_R = volume de rétention

V_S = volume de phase stationnaire

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE.....	1
-----------------------------------	----------

CHAPITRE 1 : CONCEPTS ET OUTILS	3
--	----------

1. La purification des produits naturels.....	5
1.1. Extraction.....	5
1.2. Purification	6
1.2.1. La chromatographie préparative	6
1.2.2. La chromatographie préparative liquide sur phase solide.....	8
1.2.3. La chromatographie à contre-courant.....	10
1.2.3.1. Historique et dénominations.....	10
1.2.3.2. Appareils hydrodynamiques vs appareils hydrostatiques	12
1.2.3.2.1. Appareils hydrodynamiques	12
1.2.3.2.2. Appareils hydrostatiques	13
1.2.3.3. Principe général de la chromatographie à contre-courant	15
1.2.3.4. Avantages de la technique	16
2. La notion de chimie verte	18
Références	20

CHAPITRE 2 : PURIFICATION DU CARNOSOL PAR CPC : DEVELOPPEMENT DE LA METHODE A PETITE ECHELLE.....	23
--	-----------

1. Introduction.....	25
2. Stratégie de développement en CPC	26
2.1. Analyse du soluté d'intérêt par HPLC	26
2.2. Purification du soluté d'intérêt par CPC	28
2.2.1. Choix du système solvant	28
2.2.1.1. Recherche du « meilleur solvant »	28
2.2.1.2. Composition d'un système solvant	28
2.2.2. Calcul des coefficients de partage théoriques par shake-flask.....	30
3. Matériel et méthodes	31
3.1. Liste des produits chimiques utilisés	31
3.2. HPLC.....	31
3.2.1. Instrumentation	31
3.2.2. Préparation des échantillons	32
3.2.3. Analyse des échantillons.....	32
3.3. Shake-flask.....	32
3.4. Chromatographie de Partage Centrifuge	33
3.4.1. Instrumentation	33
3.4.2. Utilisation de l'appareil de CPC.....	33
3.4.3. Préparation et injection de l'extrait de romarin	34
4. Résultats et discussion	34
4.1. Mise en évidence du carnosol dans un extrait de romarin du commerce par HPLC.....	34
4.1.1. Transfert de la méthode HPLC	35

4.1.1.1.	Méthode de référence	35
4.1.1.2.	Transfert de la méthode de séparation du romarin sur notre appareillage	37
4.1.1.3.	Injection des standards	37
4.1.1.4.	Diminution de la durée de la méthode	38
4.1.2.	Analyse HPLC des extraits	40
4.2.	Développement de la méthode CPC.....	41
4.2.1.	Recherche du « meilleur solvant ».....	41
4.2.2.	Système butanol/méthanol/eau 5/1/4.....	42
4.2.2.1.	Construction du système solvant	42
4.2.2.2.	Test du système solvant par shake-flask	43
4.2.2.3.	Test du système solvant en mode descendant	45
4.2.3.	Système heptane/méthyl <i>tert</i> -butyl éther/éthanol/eau	46
4.2.3.1.	Construction du système solvant	46
4.2.3.2.	Test du système solvant par shake-flask	47
4.2.3.3.	Test du système solvant 3/1/2/1 en mode descendant.....	48
4.2.3.4.	Test du système solvant 3/1/2/1 en mode ascendant	51
4.2.3.5.	Système solvant heptane/MTBE/éthanol/eau 3/1/3/1	53
4.2.3.6.	Système solvant heptane/MTBE/éthanol/ eau 4/1/4/1.....	54
4.3.	Quantification	56
4.3.1.	Quantité de matière contenue dans l'extrait à purifier par CPC	56
4.3.2.	Quantification du carnosol	57
5.	Conclusion et perspectives.....	59
	Références	60

CHAPITRE 3 : METHODOLOGIE DE TRANSFERT D'ECHELLE 63

1.	État de l'art	65
2.	Présentation de la méthodologie proposée	69
3.	Matériel et méthodes	70
3.1.	Matériel	70
3.2.	Préparation des échantillons à purifier	71
3.2.1.	Mélange de solutés Guess	71
3.2.2.	Extrait de romarin	71
4.	Résultats et discussion.....	72
4.1.	Mise en place de la méthodologie sur une séparation-modèle	72
4.1.1.	Sélection des différents constituants de la séparation-modèle	72
4.1.2.	Méthodologie pour le transfert d'échelle en CPC : concept et scale-up d'un petit rotor de 35 mL vers un rotor 254 mL	76
4.1.3.	Optimisation de la charge.....	86
4.1.3.1.	Notion d'isotherme de distribution.....	86
4.1.3.2.	Etude de la charge en CPC.....	87
4.1.4.	Transfert sur prototype 88 mL.....	91
4.1.4.1.	Détermination des conditions opératoires optimales sur le prototype 88 mL.....	91
4.1.4.2.	Evolution du ΔV en fonction du débit	92
4.1.4.3.	Transfert de la méthode depuis le rotor 35 mL vers le prototype 88 mL.....	93
5.	Transfert appliqué à un échantillon réel : le romarin	96
5.1.	Optimisation de la production sur rotor analytique 35 mL	96

5.1.1.1.	Conditions opératoires optimales	97
5.1.1.2.	Etude de la charge maximale	98
5.2.	Transfert sur rotor semi-préparatif 254 mL.....	100
5.2.1.	Injections analytiques et choix des conditions opératoires	101
5.2.2.	Transfert d'échelle à charge maximale par opération	102
5.2.3.	Transfert d'échelle à productivité maximale	103
5.2.4.	Scale-up linéaire.....	104
5.3.	Transfert sur un rotor préparatif 812 mL (design 1L)	106
5.3.1.	Détermination des conditions opératoires initiales	106
5.3.2.	Injection de l'échantillon de romarin sur rotor préparatif	107
5.3.2.1.	Transfert à 50 mL/min	107
5.3.2.2.	Augmentation de la productivité : essais à 100 mL/min	108
5.3.3.	Comparaison des résultats obtenus sur les différents rotors	110
6.	Conclusion et perspectives.....	112
	Références	114

CHAPITRE 4 : SOLVANTS ALTERNATIFS117

1.	Introduction.....	119
2.	Matériel et méthodes	124
2.1.	Matériel	124
2.2.	Préparation des échantillons	125
3.	Résultats et discussion	126
3.1.	Le limonène : une alternative à l'heptane, un solvant pétrolier largement utilisé en CPC	126
3.1.1.	Présentation de l'article.....	126
3.1.2.	Conclusion.....	134
3.2.	Système solvant Arizona vert	135
3.2.1.	Propriétés physico-chimiques.....	135
3.2.1.1.	Présentation de l'article	135
3.2.1.2.	Conclusion	146
3.2.2.	Système solvant Arizona vert : polarité et rétention de phase stationnaire	147
3.2.2.1.	Présentation de l'article	147
3.2.2.2.	Conclusion	156
3.3.	Application du système solvant Arizona vert à la purification du carnosol.....	157
3.3.1.1.	Shake-flasks	157
3.3.1.2.	Injection CPC.....	160
3.3.1.3.	Analyse HPLC	161
3.3.1.4.	Conclusion	163
6.	Conclusion et perspectives.....	165
	Références	166

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....169

Introduction générale

Il existe un très grand nombre de méthodes séparatives aujourd'hui utilisées dans le but de réaliser la purification de produits naturels. L'une d'entre elles, la chromatographie à contre-courant (CCC), possède de nombreux avantages poussant parfois l'utilisateur à l'envisager en complément ou en alternative aux techniques de chromatographie sur phase solide.

La chromatographie à contre-courant est une technique préparative permettant de séparer des solutés grâce à un système biphasique composé de deux liquides non miscibles. La phase stationnaire liquide est retenue dans la colonne par force centrifuge tandis que la phase mobile est poussée à travers à l'aide d'une pompe. On distingue deux types d'appareillages : les appareils hydrodynamiques et les appareils hydrostatiques ou chromatographie de partage centrifuge (CPC).

Malgré le fait que la matière première est le fruit de ce nous offre la nature, la purification de produits naturels est une branche de la chimie dont les innombrables applications ne prennent pas toujours en compte certains aspects écologiques et économiques fondamentaux. En effet, que cela soit par CPC ou toute autre technique de séparation préparative, la purification de produits naturels est le plus souvent utilisatrice de solvants pétroliers plutôt que de solvants d'origine naturelle, tout comme elle est consommatrice de grandes quantités de solvants et productrice de déchets. De plus, l'optimisation des conditions permettant d'augmenter la productivité ainsi que la maîtrise du changement d'échelle entre deux colonnes ne sont pas toujours prises en compte. Ce sont donc autant de facteurs impactant l'empreinte écologique des processus de purification.

L'objectif de cette thèse est donc de mettre en place des outils permettant de réaliser l'éco-purification de produits naturels par CPC. Le terme éco- est ici utilisé comme préfixe pour écologie, mais aussi économie. Pour cela, plusieurs aspects seront mis en avant dans le but de respecter au mieux les principes de la chimie verte, allant de la substitution des solvants pétroliers par des solvants verts, à la mise en place d'une méthodologie fiable de transfert d'échelle, tout en privilégiant l'utilisation de méthodes optimisées afin de limiter la consommation en temps et en énergie.

Nous avons choisi d'illustrer notre démarche par la purification du romarin (*Rosmarinus officinalis*) par CPC, une plante aromatique provenant de la région méditerranéenne et reconnue pour ses propriétés médicinales et gustatives. Ce végétal, très riche en composés actifs, renferme une molécule, le carnosol, comportant des propriétés très intéressantes dans la recherche et la mise en place de nouveaux principes actifs d'origine végétale.

Le chapitre 1 de ce mémoire constituera une brève présentation des différents concepts et outils qui seront évoqués par la suite.

Le chapitre 2 portera ensuite sur le développement d'une méthode de purification du carnosol provenant d'un extrait de romarin par CPC. Ce chapitre permettra ainsi de présenter la démarche à adopter dans le but de réaliser un développement de méthode cohérent en CPC. Les solvants qui seront utilisés sont des solvants couramment employés dans cette technique, afin de privilégier un comportement connu et une détection aisée. Dans le but de pouvoir réaliser l'analyse des fractions, d'en déterminer leur pureté et de quantifier la quantité de carnosol purifiée, une méthode HPLC sera également mise en place.

Le chapitre 3 portera quant à lui sur la mise en place d'une nouvelle méthodologie de transfert d'échelle en CPC (système hydrostatique), entre un rotor analytique et un rotor de plus grand volume. En effet, alors que les mécanismes de changement d'échelle sont relativement bien compris sur appareils hydrodynamiques, ces derniers s'avèrent beaucoup plus compliqués à appliquer sur appareils hydrostatiques. La méthodologie mise en place sera directement basée sur le comportement des solutés au sein des rotors en fonction du système solvant et des conditions opératoires utilisées. L'utilisateur pourra également adapter son changement d'échelle en fonction de son objectif de production. La preuve de concept, principalement présentée sous la forme d'une publication, sera dans un premier temps réalisée sur la séparation de trois solutés tests pouvant être issus de produits naturels. La seconde partie du chapitre portera sur la validation de la méthodologie sur un cas concret et complexe en réalisant un changement d'échelle sur la méthode de purification du romarin mise en place en amont. Pour chaque changement d'échelle, les productivités et consommations de solvants seront calculées afin de mettre en avant les avantages de la montée en échelle raisonnée d'une méthode en CPC.

Enfin, le dernier chapitre sera consacré à la substitution des solvants pétroliers par des solvants verts. Tout d'abord, l'étude des propriétés physico-chimiques de solvants d'origine pétrolière et analogues verts sera réalisée avant de les tester et de comparer leurs performances en CPC. Ainsi, le possible remplacement de l'heptane par du limonène, un solvant issu des déchets de l'industrie agro-alimentaire, du méthanol par de l'éthanol ou du méthyl *ter*-butyl éther par de l'acétate d'éthyle seront envisagés. Dans ce cadre, trois articles scientifiques seront présentés. La dernière partie de ce chapitre portera sur le remplacement des solvants pétroliers utilisés pour la purification du carnosol par des solvants verts, plus respectueux de l'humain et de l'environnement.

Chapitre 1

Concepts et outils

1. La purification des produits naturels

Depuis les années 1990, l'intérêt pour la recherche de nouveaux composés bioactifs provenant de produits naturels a considérablement augmenté (1). Le succès des dérivés de produits d'origine végétale tels que le Taxol®, médicament anticancéreux fabriqué à partir de la molécule de paclitaxel, originellement extraite de l'écorce de *Taxus Bretifolia* (2) a notamment permis l'introduction de très nombreux programmes de recherche sur les produits naturels dans le monde (3). Depuis, beaucoup d'efforts ont été concentrés sur la recherche de nouvelles molécules d'intérêt en provenance de produits naturels d'origines très diverses, pour des applications principalement pharmaceutiques, cosmétiques ou agroalimentaires. Lorsque des propriétés intéressantes sont découvertes sur un extrait donné, il est alors essentiel de pouvoir avoir accès à des méthodes performantes, permettant d'isoler les molécules d'intérêt de manière rapide et sûre. Pour cette raison, il est nécessaire pour l'industrie et la recherche académique de posséder dans un premier temps des techniques d'extraction puis de séparation efficaces avant de pouvoir réaliser l'identification des composés ciblés par des techniques de pointe telles que la spectrométrie de masse (MS) ou la résonnance magnétique nucléaire (RMN).

1.1. Extraction

La toute première étape dans la purification d'un extrait naturel consiste à réaliser l'extraction des composés d'intérêt de leur matrice végétale initiale. Tout comme des procédés de filtration ou de précipitation, l'extraction peut être considérée comme une étape de pré-purification car elle permet d'enlever des composés indésirables mais surtout de sélectionner et concentrer des composés d'intérêt en choisissant des solvants appropriés (1). Idéalement, une extraction doit être exhaustive, doit respecter les composés d'intérêt, être rapide, simple, peu chère et si possible automatisable. Il existe un grand nombre de méthodes traditionnelles d'extraction dont les principales sont l'extraction par Soxhlet, la macération, la percolation, la turbo-extraction ou la sonication (1). Ces dernières s'avèrent cependant souvent longues, laborieuses, consommatrices de solvants, peu efficaces et accélèrent parfois la dégradation des composés d'intérêt. Depuis quelques années, d'autres techniques comportant beaucoup moins d'inconvénients économiques et écologiques ont été développées et sont de plus en plus utilisées telles que l'extraction par fluide supercritique, l'extraction assistée par micro-ondes ou l'extraction assistée par ultrasons (1, 4, 5). Devant leurs nombreux avantages en termes d'économie de solvant, de temps, et leur très bonne efficacité, ces nouvelles techniques ont pu être classées comme techniques d'éco-extraction par l'équipe de Farid Chemat (Université d'Avignon) (4, 5).

L'extraction permet donc de séparer des composés d'intérêt de leur matrice. Il est cependant très rare voire impossible d'isoler la molécule cible seulement avec une extraction. Ainsi, une étape de purification est requise afin de fractionner l'extrait de manière sélective et d'isoler le composé de manière plus ou moins pure.

1.2. Purification

La purification consiste à réaliser la séparation des molécules d'un extrait afin de récupérer des molécules ou groupes de molécules d'intérêt et de supprimer une plus ou moins grande quantité d'impuretés indésirables. Il existe un très grand nombre de techniques séparatives pouvant être utilisées à l'échelle préparative dans le but de produire une grande quantité de solutés purifiés en provenance d'un extrait végétal. Les principales sont les méthodes de chromatographie liquide sur phase solide et les méthodes de chromatographie liquide-liquide (1, 3, 6, 7).

Après avoir abordé la notion de chromatographie préparative, nous développerons les différentes techniques de chromatographie préparative liquide sur phase solide utilisées très couramment dans le cadre de la purification d'extrait naturels. A la suite de cela, nous introduirons et détaillerons alors la technique de chromatographie à contre-courant (CCC), méthode de séparation liquide-liquide mettant en jeu un système solvant biphasique. Nous verrons quels sont les avantages et les inconvénients à utiliser cette technique en remplacement ou en complément des méthodes classiques de séparation solide-liquide.

1.2.1. La chromatographie préparative

La chromatographie est une technique séparative originellement préparative, développée par le Russe Tswett au début des années 1900 dans le but de purifier des pigments provenant d'un extrait végétal (8-11). A cette époque, toutes les applications de la chromatographie étaient préparatives. Les premières utilisations de la chromatographie en tant qu'outils analytique furent réalisées en 1931 à travers les travaux de Kuhn et Lederer, portant sur la séparation des isomères du carotène et de la xanthophylle (12, 13). Ce n'est qu'à la fin des années 60 que la chromatographie liquide fut réellement utilisée à des fins analytiques, largement provoqué par le développement de la chromatographie liquide haute performance (HPLC) (8). Aujourd'hui, malgré l'omniprésence de la chromatographie analytique, la chromatographie préparative reste une technique bien reconnue dans l'industrie, et dont les applications sont de plus en plus nombreuses (10).

Les objectifs de la chromatographie analytique et de la chromatographie préparative sont très différents. En effet, en chromatographie analytique, l'utilisateur recherche toujours la meilleure résolution (= mesure de la séparation de deux solutés), pour un temps d'analyse le plus court possible. Le but est de déterminer rapidement la composition d'un échantillon de manière précise et rapide. Lorsqu'elle est utilisée à finalité préparative, la chromatographie permet d'isoler une substance d'un mélange, avec un taux de récupération et une pureté les plus importants possibles et avec la meilleure productivité possible. Les paramètres les plus importants en chromatographie préparative sont donc :

- la vitesse (durée de purification, productivité) ;
- la résolution (pureté du composé à récupérer) ;
- la charge (quantité purifiée, productivité).

L'optimisation de chacun de ces paramètres aura une influence sur les deux autres. Par exemple, l'augmentation du débit de phase mobile (vitesse) ou de la charge de l'échantillon aura pour conséquence une diminution de la résolution (14).

Lors de leur récupération en sortie de colonne, la mesure de la pureté et du taux de récupération des solutés permettent d'évaluer la qualité de la séparation réalisée. La pureté des solutés récupérés P_R est une contrainte donnée par le cahier des charges de l'utilisateur. Elle est exprimée en pourcentage de soluté pur dans la masse totale d'échantillon récupéré. Le taux de récupération T_R en % correspond quant à lui au rapport de la quantité de soluté récupéré Q_s à la fin d'une opération de purification sur la quantité de soluté injecté Q_{inj} :

$$T_R(\%) = \frac{Q_s}{Q_{inj}} \times 100 \quad \text{Équation 1}$$

Si aucune perte d'échantillon n'est engendrée par la colonne, un retour à la ligne de base entre les pics des solutés à séparer permet théoriquement d'obtenir un taux de récupération et une pureté de 100 %, tandis que des bandes chevauchantes auront pour conséquence la diminution de la pureté et/ou du taux de récupération (Figure 1).

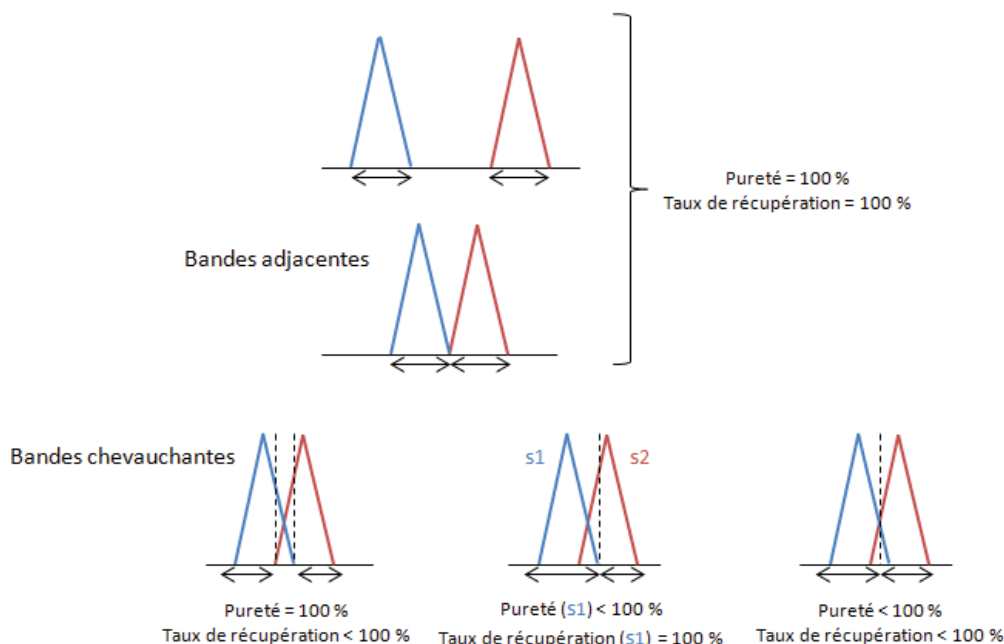


Figure 1 : Influence de la qualité de séparation sur la pureté et le taux de récupération des solutés.

La notion de rendement est aussi très importante en chromatographie préparative car elle décrit la quantité produite en fonction du temps et permet de réaliser des comparaisons avec d'autres techniques ou conditions opératoires. On définit ainsi le rendement horaire R_h ou productivité comme la valeur correspondant au ratio de la quantité de soluté récupérée Q_s par opération sur la durée d'une opération t :

$$R_h = \frac{Q_s}{t} \quad \text{Équation 2}$$

Le rendement horaire d'une purification par chromatographie peut être optimisé en diminuant la durée d'une opération ou en augmentant la quantité injectée. Ces actions peuvent cependant avoir une conséquence sur la qualité de séparation des solutés entre eux, entraînant une diminution de leur pureté.

1.2.2. La chromatographie préparative liquide sur phase solide

La chromatographie liquide sur phase solide est une technique qui repose sur un équilibre entre l'adsorption de solutés sur une phase stationnaire solide et leur élution à l'aide d'une phase mobile dans le but de les séparer. En chromatographie préparative, la phase stationnaire des colonnes chromatographiques est le plus souvent composée de particules de silice vierge, peu chères et compatibles avec un grand nombre de solvants de polarités très différentes. D'autres types de phases stationnaires telles que les particules de silice greffées sont de plus en plus utilisées aujourd'hui. Elles permettant entre autres une diminution du risque de décomposition de l'échantillon et d'adsorption irréversibles (14). La pureté et la nature des solvants utilisés en tant que phase mobile est un aspect très important en chromatographie préparative, ces solvants devant par la suite être éliminés des échantillons récupérés. Ils doivent donc être facilement évaporables et ne doivent pas comporter une quantité d'impuretés trop importantes car ces dernières peuvent par la suite se retrouver dans l'échantillon de manière concentrée. L'ajout d'additifs non volatiles dans la phase mobile peut également poser problème dans la récupération des composés purifiés.

Il existe une très grande variété de méthodes de chromatographie préparative liquide sur phase solide. Le choix d'une méthode chromatographique ou d'une autre dépend principalement de la pureté de l'extrait ou de la fraction mais aussi de l'objectif final. Ainsi, tandis que les méthodes telles que la chromatographie flash ou la chromatographie liquide basse pression seront utilisées pour fractionner de grandes quantités d'échantillons de manière économique, la chromatographie liquide moyenne pression ou la chromatographie liquide haute performance (HPLC) semi-préparative et préparative seront utilisées dans le but d'avoir une meilleure résolution chromatographique et d'ainsi augmenter la pureté des composés à haute valeur ajoutée (7).

Les principales techniques de chromatographie liquide préparative sur phase solide utilisées dans le cadre de la purification d'extraits naturels sont (1, 7, 14-17) :

- La chromatographie préparative planaire : Les méthodes de chromatographie préparative planaire sont des méthodes fréquemment utilisées du fait de leur facilité d'usage et de leur bas coût à l'achat et à l'utilisation. Cependant, leurs applications sont beaucoup plus restreintes que la plupart des méthodes chromatographiques sur colonne. L'un des avantages de la technique est le grand nombre de possibilités de méthodes de détections chimiques spécifiques à des classes de molécules. Le principe de la chromatographie planaire repose sur la migration d'un ou plusieurs solvants sur une plaque constituée d'un support inerte sur lequel est déposée une fine couche de phase stationnaire (200 à 250 μm), le plus souvent composée de gel de silice. Si quelques applications engagent des quantités purifiées de l'ordre du gramme, la plupart des applications de chromatographie planaire permettent plutôt de purifier des quantités de matériel végétal de l'ordre du milligramme.

- La chromatographie éclair (*flash-chromatography*, 2 bar) : La méthode est composée d'une colonne de verre remplie d'une phase stationnaire solide appropriée. L'échantillon est introduit au sommet de la colonne et est élué à l'aide de solvants pressurisés à l'air comprimé (environ 1 bar au-dessus de la pression atmosphérique). En fonction de la taille de la colonne, une quantité d'échantillon comprise entre 0,01 et 10 g peut être purifiée en une quinzaine de minutes.

- La chromatographie liquide basse pression (LPLC = *Low-Pressure Liquid Chromatography*, < 5 bar) : Tandis que la chromatographie éclair ne nécessite que très peu d'équipement, et est caractérisée par sa simplicité, les systèmes de chromatographie basse pression, légèrement plus complexes, incluent une

pompe. La colonne est souvent composée de verre, à l'intérieur de laquelle est maintenue la phase stationnaire à l'aide d'un fritté. La taille des particules de phase stationnaire est grande (40 à 60 μm), permettant de travailler à des débits élevés pour des pressions relativement faibles. Ce type de colonne permet la séparation de quantités proches du gramme avec des résolutions parfois voisines de l'HPLC. Dans certains cas, pour avoir de meilleures résolutions ou de meilleures charges, il est possible de coupler plusieurs colonnes en série. La facilité de réalisation de séparations à basse pression est la raison pour laquelle ces colonnes sont encore beaucoup utilisées. Cependant, les purifications réalisées sur des échantillons de plus de 5 g restent difficiles à effectuer, ce qui peut pousser l'utilisateur à utiliser d'autres techniques encore plus performantes.

- La chromatographie liquide moyenne pression (MPLC = *Medium-Pressure Liquid Chromatography*, 5-20 bar) : La technique de MPLC implique des colonnes plus longues qui comprennent des diamètres plus larges et requièrent des pressions plus importantes que la LPLC. Cette technique permet des débits relativement importants (25 à 150 mL/min). Couplé avec un système simple de pompage (air comprimé ou pompe à piston), la MPLC peut être complémentaire des systèmes de chromatographie éclair, en alliant une meilleure résolution et des temps de séparation plus courts.

- La chromatographie liquide haute pression (HPLC = *High-Pressure Liquid Chromatography*, > 20 bar) : Les systèmes HPLC utilisés dans la purification de produits naturels sont le plus souvent semi-préparatifs (de 1 à 100 mg) ou préparatifs (plusieurs grammes). Cependant, si l'objectif est de purifier seulement quelques milligrammes d'échantillon, des colonnes analytiques peuvent également être utilisées. Au fil des années, l'HPLC préparative est devenue la méthode la plus commune pour la purification de produits naturels. Elle est robuste, polyvalente, rapide et peut être utilisée dans le cadre de purification de mélanges complexes. La principale différence entre l'HPLC et les autres techniques à plus basse pression est la taille des particules, beaucoup plus faible dans le cas de l'HPLC (entre 3 et 10 μm). C'est pour cette raison que la pression engendrée au sein de la colonne est beaucoup plus importante. Cette petite taille de particules permet une meilleure cinétique d'échange et donc une meilleure résolution. Les diamètres de colonne sont généralement compris entre 10 et 100 mm. Si la séparation doit être effectuée sur des quantités de l'ordre du gramme, les systèmes peuvent comporter des colonnes de diamètre interne supérieur à 100 mm.

- La chromatographie par fluide supercritique (SFC = *Supercritical-Fluid Chromatography*) : La chromatographie SFC est une technique dont la phase mobile n'est plus un liquide mais un fluide supercritique, c'est-à-dire un gaz comprimé au-delà de sa température critique et haute pression. La technique de SFC préparative comporte de très nombreux avantages comme la rapidité d'exécution des purifications de par la faible viscosité de la phase mobile, une très bonne efficacité chromatographique ou une séparation aisée des produits finaux de leurs solvants. En SFC, la vitesse linéaire de la phase mobile et la durée de vie des colonnes sont plus importantes. Le fluide supercritique le plus souvent utilisé en SFC est le CO_2 supercritique, chimiquement inerte. Le CO_2 est non-inflammable, non toxique, sans odeur, peu cher même à très haute pureté et ne pose pas ou très peu de problèmes d'élimination de solvants. En SFC préparative, la limite de solubilité est le plus souvent imposée par la solubilité de l'échantillon dans le fluide supercritique et non pas par la capacité de la colonne. Cette technique peut aisément permettre la purification de composés d'une quantité de l'ordre du gramme.

1.2.3. La chromatographie à contre-courant

La chromatographie à contre-courant est une technique préparative liquide-liquide permettant de séparer des solutés grâce à un système biphasique composé de deux liquides non miscibles. La phase stationnaire liquide est retenue dans la colonne par force centrifuge tandis que la phase mobile est poussée à travers à l'aide d'une pompe.

La chromatographie à contre-courant est une technique très utilisée dans le cadre de la purification d'extraits naturels, de par ses nombreux avantages tels que la très grande diversité de phase stationnaires et mobiles utilisables, la capacité de charge importante (de l'ordre du kg pour les plus grosses machines), la récupération possible et aisée de l'échantillon en cas d'absorption irréversible et la possibilité d'injection d'échantillons à matrice dense ou visqueuse (18).

1.2.3.1. Historique et dénominations

L'ancêtre de la chromatographie à contre-courant a été inventé dans les années 1940 par le Dr. Lyman C. Craig, qui développa la distribution à contre-courant (*ou CCD pour CounterCurrent Distribution*) appelée aussi « machine de Craig » (18-20). Ces appareils ont été conçus pour réaliser la séparation de solutés comportant différents coefficients de partage à l'aide d'un mélange biphasique de solvants. Ils sont composés d'une série de tubes de verre (Figure 2) conçus de manière à ce que la phase légère puisse être transférée d'une unité à la suivante, tandis que la phase lourde est toujours maintenue dans le même tube par force de gravitation (Figure 3). Au cours des années 1950, les appareils de CCD furent très largement utilisés dans le but de réaliser la purification de matériels d'origine naturelle (19).

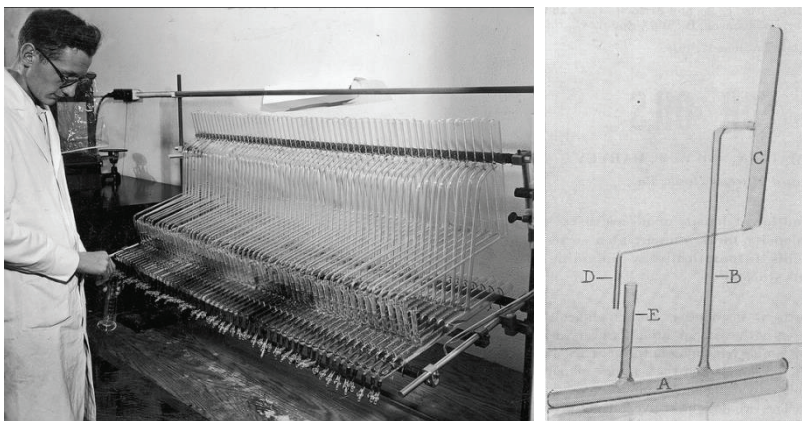


Figure 2 : À gauche : étudiant utilisant une machine de Craig, 1951 (Copyright 2012, Iowa State University Library). À droite : schéma d'une unité individuelle de la machine de Craig (21).

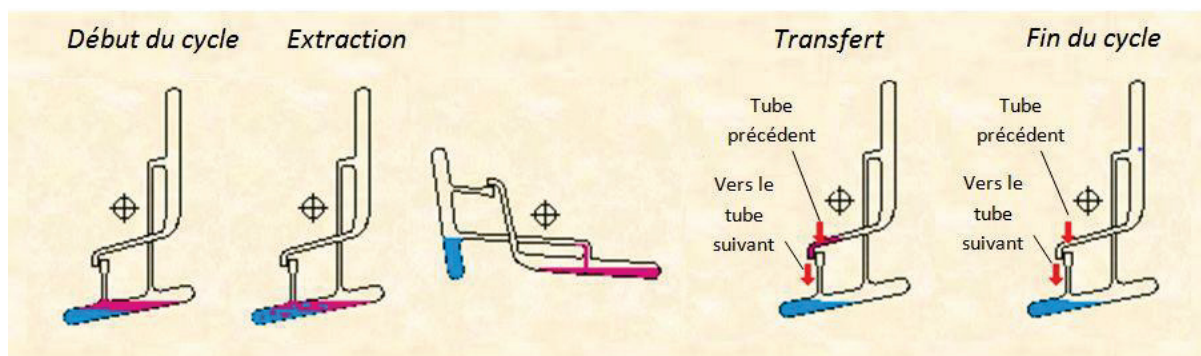


Figure 3 : Principe d'utilisation d'une unité de la machine de Craig, schéma modifié d'après (22).

Ce n'est qu'en 1966 au Japon, que Y. Ito proposa une nouvelle technique, pour laquelle il eut l'idée de retenir l'une des phases par force centrifuge au lieu de la force gravitationnelle (23). C'est l'apparition de la chromatographie à contre-courant (CCC) moderne. A partir de cette invention s'en suivirent deux directions dans le développement de la CCC. La première, poursuivie par Ito aux Etats-Unis, est basée sur le développement d'une très vaste gamme d'appareils également appelés chromatographie à contre-courant ou appareils hydrodynamiques, dont le plus utilisé est basé sur la variation de la force centrifuge produite par un mécanisme composé de deux axes de rotation. La seconde, développée par K. Nunogaki au Japon, comporte un seul axe de rotation et ainsi une force centrifuge constante. Ces appareils sont appelés chromatographie de partage centrifuge (CPC) ou instruments hydrostatiques (24).

L'utilisation de l'appellation chromatographie à contre-courant divise aujourd'hui les experts de la technique (25, 26). Tout d'abord, l'utilisation du nom chromatographie à contre-courant porte à confusion puisqu'il est utilisé d'une part pour nommer la technique en général mais aussi pour désigner les appareils hydrodynamiques. D'autre part, en chromatographie à contre-courant, il n'y a jamais de contre-courant. La technique tient en réalité du nom qu'avait donné Craig à sa machine : l'appareil de distribution à contre-courant (27, 28). Cependant, cela fait plus de 40 ans que les scientifiques continuent à publier des articles contenant le nom de chromatographie à contre-courant, et il paraît aujourd'hui difficile de changer l'appellation de la technique, reconnue en tant que telle (25, 27). Ainsi, nous utiliserons le terme chromatographie à contre-courant dans la suite de ce manuscrit seulement dans le but de nommer la technique en général. Se distinguerons ensuite les appareils hydrodynamiques et les appareils hydrostatiques (ou CPC pour chromatographie de partage centrifuge) (Figure 4). Ces deux types d'appareils seront décrits dans la suite de ce chapitre (Section 1.2.3.2).

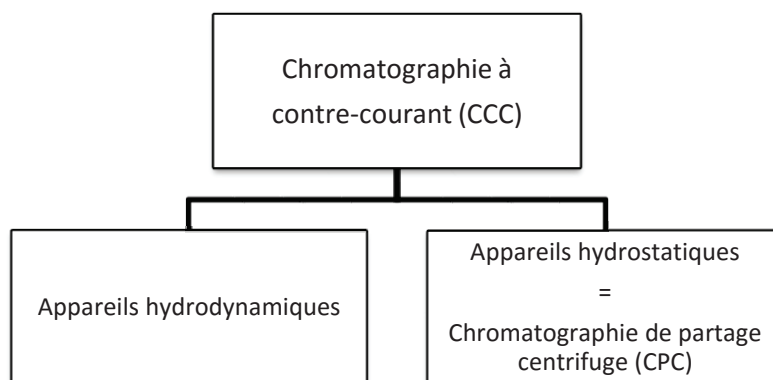


Figure 4 : Dénomination des différents appareils de chromatographie à contre-courant

1.2.3.2. Appareils hydrodynamiques vs. appareils hydrostatiques

1.2.3.2.1. Appareils hydrodynamiques

Les appareils hydrodynamiques sont composés de deux axes de rotation : un axe central et un axe planétaire, générant une force centrifuge variable. Un appareil hydrodynamique peut comporter plusieurs axes planétaires, généralement de 1 à 3, chacun composé d'une bobine sur laquelle est enroulée la colonne composée de tubes de Téflon® (Figure 5).

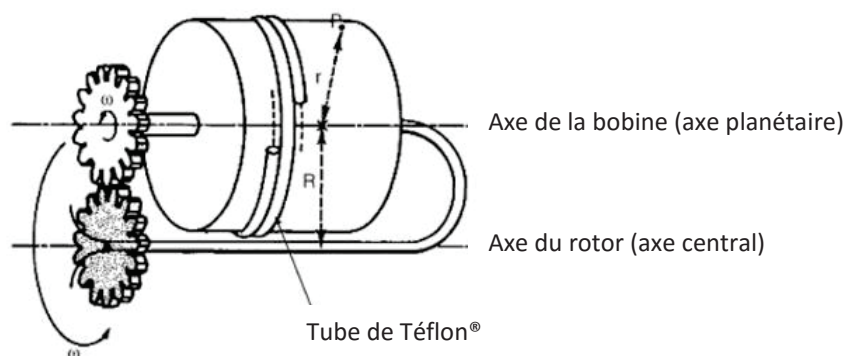


Figure 5 : Schéma représentant les différents axes de rotation ainsi que la disposition d'une bobine au sein d'un appareil hydrodynamique (29).

Sur les systèmes hydrodynamiques, les échanges chromatographiques sont générés par la variation de la force centrifuge qui crée des zones de mélange et des zones de décantation au sein de la colonne. Le contact entre les phases stationnaire et mobile est ainsi continu (Figure 6).

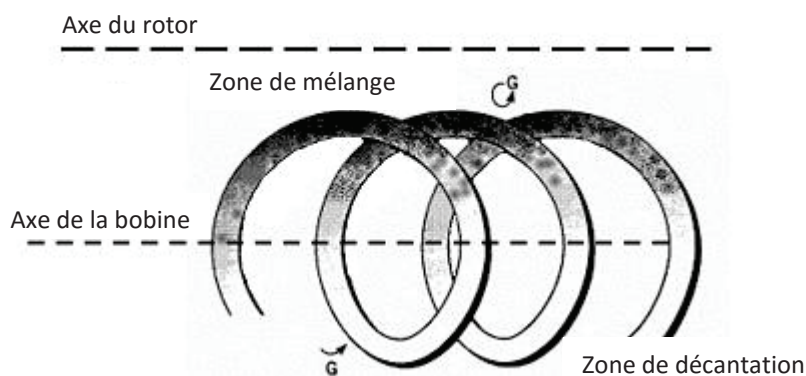


Figure 6 : Comportement du liquide sur un appareil hydrodynamique (29, 30)

Le laboratoire de chromatographie de l'Institut des Sciences Analytiques est équipé d'un appareil hydrostatique Spectrum Dynamic Extraction (Slough, UK), illustré Figure 7.

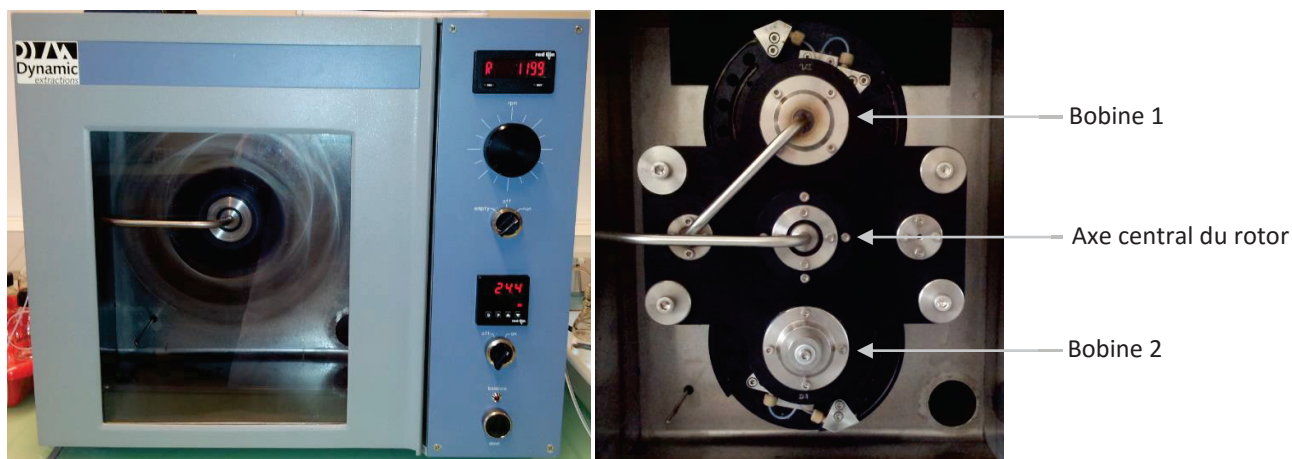


Figure 7 : Appareil hydrodynamique Dynamic Extraction. Cet appareil est composé de deux bobines disposées autour de l'axe central. Il comporte au total 4 sections de tubes de volumes respectifs de 10 mL, 11 mL, 66 mL et 69 mL, pouvant être utilisées ensemble ou indépendamment les uns des autres. A gauche : appareil en fonctionnement à 1200 rpm. A droite : zoom sur l'axe central et les bobines.

1.2.3.2.2. Appareils hydrostatiques

Les appareils hydrostatiques ou CPC possèdent un design totalement différent des appareils hydrodynamiques. Ils sont composés de disques en inox empilés les uns aux autres, chacun gravé de cellules et de canaux (Figure 8). Ces disques métalliques, eux-mêmes séparés par des disques de Téflon®, sont assemblés autour d'un axe central unique délivrant à la colonne une force centrifuge constante. L'ensemble des cellules et canaux forment la colonne, également appelée rotor. Dans le cas des CPC, le liquide est transféré dans le rotor puis vers la sortie de la colonne à travers deux joints rotatifs, comportant une partie statique et une partie rotative. Sur certains appareils, une cuve alimentée par un liquide de refroidissement peut être mise en place car les forces de friction créées par la rotation du rotor peuvent générer un échauffement au sein du système, pouvant alors engendrer un déséquilibre de la solubilité des phases entre elles et une modification des coefficients de partage des composés purifiés au cours de l'opération (Figure 9).

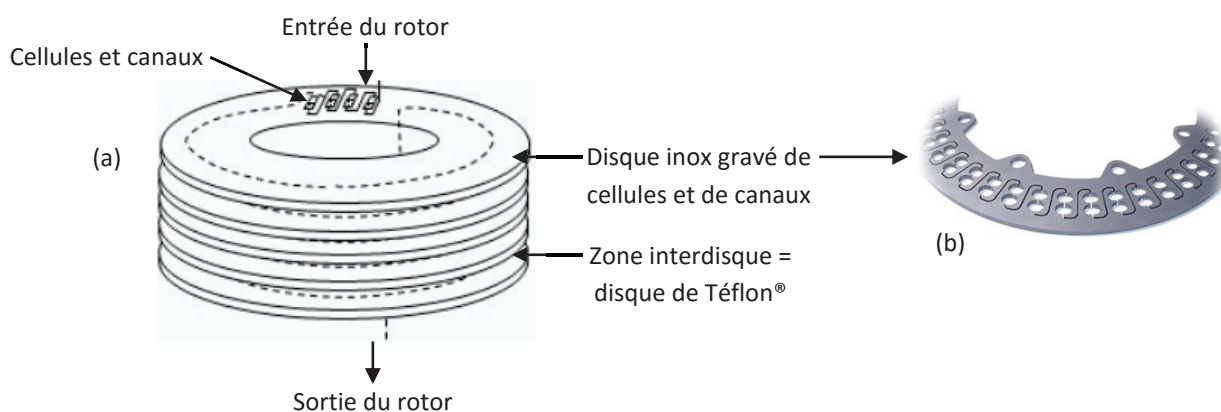


Figure 8 : (a) Empilement de disques en inox et en Téflon® formant un rotor, d'après (31). (b) Une portion d'un disque d'un rotor Kromaton, gravé de doubles-cellules reliées par des canaux.

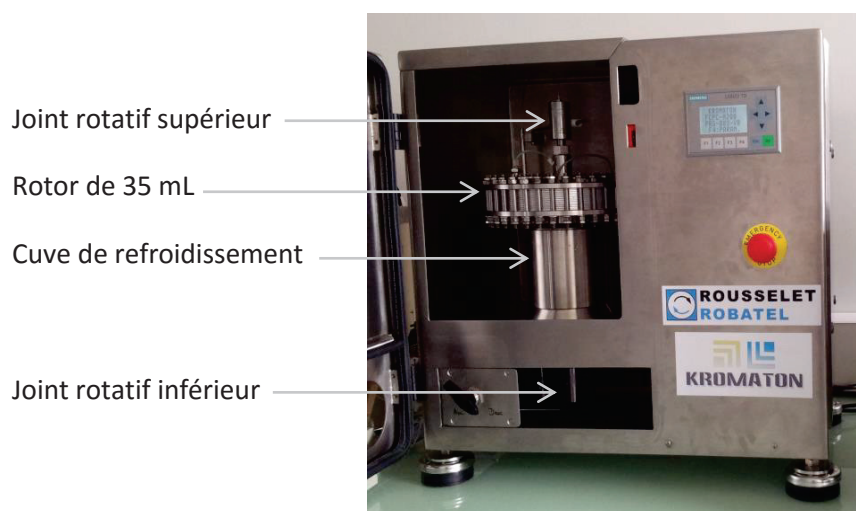


Figure 9 : FCPC-A Rousselet-Robatel-Kromaton monté d'un rotor de volume réel 35 mL.

Dans les systèmes de CPC, les échanges chromatographiques ont lieu dans les cellules (Figure 8b), qui contiennent à la fois la phase stationnaire, retenue par force centrifuge et la phase mobile, poussée à travers par un système de pompage. Les canaux sont quant à eux exclusivement remplis de phase mobile, la phase stationnaire ne pouvant être retenue. Le fait qu'il n'y ait que de la phase mobile dans les canaux reste un aspect défavorable en CPC car aucun échange chromatographique ne peut être effectué, créant un volume mort et augmentant ainsi la dispersion.

Au laboratoire de l'ISA, quatre appareils de CPC Kromaton sont actuellement disponibles : deux appareils FCPC-A200 (Figure 9) pouvant contenir des rotors interchangeables de volumes allant de 25 mL à 1L ; un FCPC-C25, contenant un rotor de 35 mL (Figure 10) et un FCPC-E25 contenant également un rotor de 35 mL et ayant la particularité d'être ATEX (matériel adapté aux atmosphères explosives) (Figure 10).



Figure 10 : À gauche : FCPC-C25 Kromaton contenant un rotor de 35 mL. À droite : FCPC-E25 Kromaton monté d'un rotor 35 mL.

1.2.3.3. Principe général de la chromatographie à contre-courant

La chromatographie à contre-courant est, comme son nom l'indique, une méthode de chromatographie, avec comme spécificité que la phase stationnaire n'est pas un solide mais un liquide. Le mécanisme de rétention n'est donc pas généré par l'adsorption des solutés sur la phase stationnaire mais par un partage liquide-liquide des solutés entre les phases stationnaires et mobiles, représenté par le coefficient de partage K_D du soluté dans le système biphasique :

$$K_d = \frac{[\text{soluté}]_{\text{phase stationnaire}}}{[\text{soluté}]_{\text{phase mobile}}} \quad \text{Équation 3}$$

Expérimentalement, le coefficient de partage d'un composé peut être calculé à l'aide de son volume de rétention V_R :

$$V_R = V_M + K_d \cdot V_S \quad \text{Équation 4}$$

Avec V_M le volume mort de la colonne, ou volume de phase mobile contenu dans la colonne, K_D le coefficient de partage du soluté et V_S le volume de phase stationnaire contenu dans la colonne.

La valeur du coefficient de partage permet de montrer l'affinité des solutés pour l'une ou l'autre des phases, selon si sa valeur est égale, inférieure ou supérieure à 1. Lorsque le coefficient de partage est égal à 1, le soluté se partage de manière égale entre la phase stationnaire et la phase mobile. Le volume de rétention du soluté est alors constant et égal au volume colonne quel que soit le taux de phase stationnaire. Lorsque le coefficient de partage est inférieur à 1, le soluté a une meilleure affinité pour la phase mobile. Son volume de rétention est alors faible et reste inférieur au volume colonne. Lorsque le taux de phase stationnaire diminue au sein de la colonne, son volume de rétention aura alors tendance à augmenter. Au contraire, si le coefficient de partage d'un soluté est supérieur à 1, ce dernier a plus d'affinité pour la phase stationnaire. Son volume de rétention est alors supérieur au volume colonne et augmente linéairement en fonction de la valeur du K_D (30). Si une diminution du taux de phase stationnaire est observée dans le cas d'un coefficient de partage supérieur à 1, le volume de rétention du soluté aura alors tendance à diminuer. Ainsi, il est possible de travailler avec des composés dont le coefficient de partage est très élevé, sans engendrer des temps de purification trop longs en opérant avec une colonne dont le taux de phase stationnaire est faible.

Lors d'une opération, la colonne chromatographique est dans un premier temps entièrement remplie de phase stationnaire. Une force centrifuge est alors appliquée afin de retenir la phase stationnaire au sein de la colonne. Dès lors, la phase mobile est introduite dans la colonne et déplace une partie de la phase stationnaire vers la sortie tout en établissant un équilibre chromatographique au sein de la colonne. Le volume de phase stationnaire déplacé peut être mesuré en sortie de colonne à l'aide d'une éprouvette graduée. Il correspond au volume de phase mobile contenu dans la colonne.

Le taux de phase stationnaire S_f (en %) contenu dans la colonne peut être déterminé expérimentalement par le calcul du rapport entre le volume de phase stationnaire et le volume de la colonne :

$$S_f(\%) = \frac{V_S}{V_C} \times 100 \quad \text{Équation 5}$$

Nous verrons dans les chapitres suivants qu'il est également possible de calculer le volume de phase stationnaire contenu dans la colonne par injection d'un composé non retenu ou marqueur de volume mort, permettant d'en déduire le volume de phase mobile contenu au sein de la colonne et donc le volume de phase stationnaire.

La perte de charge sur une machine CCC est donnée par (30) :

$$\Delta P = \underbrace{A \cdot \Delta d \cdot \omega^2 \cdot S_f}_{\text{Hydrostatique}} + \underbrace{B \cdot \eta \cdot F}_{\text{Hydrodynamique}} \quad \text{Équation 6}$$

Avec A et B des constantes dépendantes de l'appareillage et du système liquide utilisé, Δd la différence de densité entre les phases supérieures et inférieures du système solvant, ω la vitesse de rotation du rotor, S_f le taux de phase stationnaire, η la viscosité de la phase mobile et F le débit de la phase mobile.

Le premier terme de l'équation est appelé terme hydrostatique tandis que le second est le terme hydrodynamique. Sur les instruments hydrodynamiques, la valeur de A est très faible, engendrant une faible contribution du terme hydrostatique. Le terme hydrodynamique est quant à lui prédominant, apportant une perte de charge n'excédant jamais 5 à 6 bars (30). Sur les appareils de CPC, le terme hydrostatique est cette fois-ci prédominant. La perte de charge est beaucoup plus importante que sur les systèmes hydrodynamiques et elle doit être surveillée notamment pour des taux de phase stationnaire élevés, afin de ne pas dépasser les valeurs limites autorisées par les constructeurs (60-80 bars) dans le but de ne pas endommager les appareils (joints rotatifs).

1.2.3.4. Avantages de la technique

L'un des avantages de la technique de CCC réside dans la possibilité d'utiliser l'une ou l'autre phase du système biphasique en tant que phase stationnaire. Pour un système solvant donné, une purification pourra ainsi avoir lieu en phase normale comme en phase inverse selon la polarité de la phase stationnaire. Pour cela, il est possible de travailler selon deux modes différents : le mode descendant ou le mode ascendant (Figure 11).

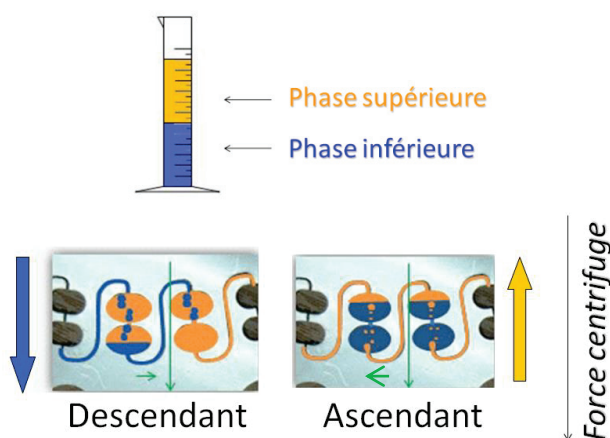


Figure 11 : Présentation du comportement des solvants lors de l'utilisation des modes ascendant et descendant sur un appareil de CPC. La phase supérieure du système solvant est en jaune, la phase inférieure en bleu.

Un système solvant biphasique comporte une phase supérieure (en jaune) et une phase inférieure (en bleu). Si l'utilisateur souhaite utiliser la phase supérieure de son système solvant comme phase stationnaire, il se placera en mode descendant. La phase mobile sera alors la phase inférieure. Au contraire, si l'utilisateur fait le choix d'utiliser la phase inférieure comme phase stationnaire, il se placera alors en mode ascendant, la phase mobile devenant ainsi la phase supérieure.

L'utilisation d'un système biphasique liquide permet également au soluté d'avoir accès à l'intégralité du volume de phase stationnaire. La capacité de charge est ainsi bien meilleure qu'en HPLC où seule la surface de la phase stationnaire est accessible par le soluté. La saturation de la phase stationnaire (surcharge) est observée beaucoup moins rapidement en CCC qu'en HPLC (32).

Un autre avantage de la phase stationnaire liquide est que son renouvellement est très simple à réaliser. Dès lors, il y a peu de risques de perte d'échantillon puisque si un soluté est absorbé de manière infinie par la phase stationnaire, il est toujours possible de vider la colonne par extrusion afin de le récupérer. Ceci est un grand avantage lors de la purification de composés à haute valeur ajoutée. La technique est de ce fait très utilisée pour le préfractionnement ou la purification de mélanges complexes tels que les produits naturels, comportant des composés de polarités très différentes et risquant de souiller facilement la phase stationnaire.

De plus, l'utilisation d'une phase stationnaire composée de solvants reste beaucoup moins coûteuse qu'en HPLC où les phases stationnaires restent souvent très chères, surtout dans le cas de purifications spécifiques.

Enfin, en CCC, la sélectivité reste unique puisqu'il existe un grand nombre de possibilités de systèmes solvants, tant dans la nature des solvants utilisés pour créer le système biphasique que dans les proportions utilisées pour chaque solvant.

Tous ces avantages, exclusivement liés à l'utilisation d'une phase stationnaire liquide, dépassent grandement les inconvénients technologiques engendrés par la technique, comme une moins bonne efficacité en CCC qu'en HPLC préparative et parfois une certaine difficulté à retenir des phases stationnaires trop visqueuses ou dont les différences de densité restent trop faibles.

La CCC est donc une technique complémentaire des autres systèmes préparatifs, qui peut être utilisée soit dans le cas où l'on chercherait à améliorer un paramètre devenu critique dans les techniques plus conventionnelles (phase stationnaire devenue trop chère, adsorption irréversible d'un soluté à haute valeur ajoutée, etc.), soit en apportant une sélectivité différente des techniques chromatographiques sur phase solide.

2. La notion de chimie verte

La chimie occupe une place à part parmi les sciences dites dures. En effet, en plus de la science dédiée à l'étude de la structure de la matière à l'échelle moléculaire, de ses propriétés et de ses transformations, la chimie est également une industrie parmi les plus importantes du monde en termes de chiffre d'affaires et d'emploi (33). Dans les pays industrialisés, la chimie est omniprésente dans le quotidien de chacun : santé, hygiène, bâtiment, électronique, cosmétiques et parfums ou agriculture et agroalimentaire. Elle est cependant victime d'une image plutôt péjorative pour le grand public, qui n'a pas conscience de son importante contribution à notre qualité de vie. En effet, malgré ses nombreuses applications bénéfiques, cette discipline connote très souvent avec des événements négatifs tels que la pollution environnementale qu'elle engendre, sa toxicité ou les accidents qu'elle a pu provoquer au cours de notre histoire (AZF, Bhopal, Seveso, etc.) (33, 34). La modification de notre consommation, accompagnée du fort développement industriel qui a eu lieu au cours du XX^{ème} siècle nous ont effet amené à subir des conséquences chimiques désastreuses, engendrant malheureusement une prise de conscience et un durcissement trop tardif de la réglementation.

Face à ce constat, le concept de chimie verte est apparu au début des années 1990, développé par Paul Anastas et John C. Warner (34). L'une des vocations de la chimie verte est de corriger cette image négative, par son action et ses préoccupations. Les 12 principes de la chimie verte qu'ils mirent en place restent à ce jour la meilleure définition pratique de cette nouvelle chimie (35). Ces principes peuvent en effet s'appliquer et s'adapter à tous les aspects de la discipline.

Les 12 principes de la chimie verte sont les suivants (33, 35):

1. Prévenir et limiter la production de déchets
2. Concevoir des produits et des composés chimiques avec pas ou peu de toxicité
3. Faire des réactions chimiques avec des produits/réactifs avec peu ou pas de toxicité
4. Préférer les matières premières renouvelables (biomasse...) à celles fossiles (hydrocarbures, charbon)
5. Utiliser au maximum des catalyseurs dans les réactions chimiques afin de minimiser les quantités de réactifs utilisés et de déchets produits
6. Minimiser l'utilisation de composés réactionnels intermédiaires
7. Favoriser le meilleur rendement réactionnel possible : utiliser au maximum les matières premières pour minimiser les déchets produits
8. Utiliser des solvants plus sûrs et moins toxiques : remplacement des solvants organiques
9. Rechercher l'efficacité énergétique de la réaction : travailler à température et pression ambiante quand cela est possible
10. Concevoir des produits chimiques qui se décomposeront en composés inertes et qui ne s'accumuleront pas dans l'environnement
11. Analyser en continu toutes les réactions de transformations pour détecter immédiatement la production de sous-produits afin de les minimiser, voire les éliminer
12. Concevoir des produits chimiques dans des formes appropriées afin de limiter les risques d'accident

Tandis que certains de ces principes s'appliquent surtout à la chimie de synthèse, d'autres peuvent être employés voire adaptées à la purification des produits naturels tels que l'utilisation de solvants moins toxiques et plus sûrs, la préférence pour des matières premières renouvelables (solvants de purification), la prévention ou la limitation de la production de déchets ou la recherche du meilleur rendement possible.

Ainsi, pour intégrer la chimie verte dans les process de purification des produits naturels, il pourrait être envisagé de modifier les solvants utilisés de manière systématique par des solvants moins toxiques ou dangereux pour l'homme et l'environnement, et/ou provenant de ressources renouvelables (agrosolvants) au lieu de pétrolières. De même, la diminution de la production de déchets peut être envisagée en favorisant le développement de méthodes de purification à petite échelle et en améliorant leur transfert à échelle pilote lorsque la production demande à être augmentée. En chromatographie préparative, la notion d'amélioration de la productivité est très importante, car elle permet de réaliser des économies énergétiques tout en fabriquant plus de matière purifiée. Cet aspect entre également tout à fait dans les principes de la chimie verte puisque le rendement est favorisé. En prenant en compte les points cités ci-dessus, les termes « purification des produits naturels » pourraient alors être employés sous l'appellation « éco-purification des produits naturels », puisque sont privilégiés à la fois les aspects écologiques et les aspects économiques.

Ainsi dans la suite de ce manuscrit, nous chercherons à intégrer le plus souvent possible certains des principes de la chimie verte sur la purification par CPC du carnosol provenant d'un extrait de romarin. Le chapitre 2 consistera à développer la méthode de purification du carnosol à petite échelle, afin de limiter la consommation de solvants et la production de déchets, tout en limitant la consommation d'énergie. Le chapitre 3 sera consacré à la mise en place d'une méthodologie de changement d'échelle (ou *scale-up*) en CPC, dans le but de pouvoir augmenter facilement la productivité d'une méthode de purification, sans avoir à la redévelopper à grande échelle. L'utilisation de cette nouvelle méthodologie pourra permettre à un utilisateur CPC de réduire considérablement sa consommation de solvants et d'énergie, tout comme sa génération de déchets chimiques. Cette méthodologie de changement d'échelle sera appliquée dans le cadre de la purification du carnosol réalisée dans le chapitre 2. Enfin, le dernier chapitre sera axé sur l'étude et le remplacement de solvants pétroliers couramment utilisés en CPC et lors de la purification du carnosol, par des solvants beaucoup plus respectueux de l'homme et l'environnement.

Références

1. O. Sticher, Natural product isolation. *Natural Product Reports* **25**, 517-554 (2008).
2. M. E. Wall, M. C. Wani, Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. *Journal of Ethnopharmacology* **51**, 239-254 (1996).
3. K. Hostettmann, A. Marston, M. Hostettmann, in *Preparative Chromatography Techniques: Applications in Natural Product Isolation*, K. Hostettmann, A. Marston, M. Hostettmann, Eds. (Springer Berlin Heidelberg, 1998), pp. V-VI.
4. F. Chemat, *Éco-extraction du végétal: procédés innovants et solvants alternatifs*. L'Usine nouvelle. Série Chimie (Dunod, 2011).
5. S. Both, J. Strube, G. Cravatto, in *Green Extraction of Natural Products: Theory and Practice*, F. Chemat, J. Strube, Eds. (Wiley, 2015), chap. 4, pp. 101-144.
6. A. Marston, K. Hostettmann, Modern separation methods. *Natural Product Reports* **8**, 391-413 (1991).
7. F. Bucar, A. Wube, M. Schmid, Natural product isolation - how to get from biological material to pure compounds. *Natural Product Reports* **30**, 525-545 (2013).
8. R. P. W. Scott, in *Book 12 - Preparative chromatography*, C.-E. B. Series, Ed. (2003).
9. G. Guiochon, Preparative liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **965**, 129-161 (2002).
10. J. Newburger, L. Liebes, H. Colin, G. Guiochon, in *Preparative Scale Chromatography*, E. Grushka, Ed. (Taylor & Francis, 1988), chap. 8, pp. 141-160.
11. G. Guiochon, A. Felinger, D. G. Shirazi, A. M. Katti, in *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*, G. Guiochon, A. Felinger, D. G. Shirazi, A. M. Katti, Eds. (Elsevier Science, 2006), chap. 1, pp. 1-18.
12. R. L. Wixom, in *Chromatography - A century of discovery 1900-2000.*, G. Meurant, Ed. (Elsevier Science, 2001), chap. 1, pp. 1-38.
13. E. Lederer, La renaissance de la méthode chromatographique de M. Tswett en 1931. *Journal of Chromatography A* **73**, 361-366 (1972).
14. K. Hostettmann, A. Marston, M. Hostettmann, in *Preparative Chromatography Techniques: Applications in Natural Product Isolation*. (Springer Berlin Heidelberg, 1998), chap. 5, pp. 50-127.
15. K. Hostettmann, A. Marston, M. Hostettmann, in *Preparative Chromatography Techniques: Applications in Natural Product Isolation*, K. Hostettmann, A. Marston, M. Hostettmann, Eds. (Springer, 1998), chap. 3, pp. 15-32.
16. K. Hostettmann, A. Marston, M. Hostettmann, in *Preparative Chromatography Techniques: Applications in Natural Product Isolation*, K. Hostettmann, A. Marston, M. Hostettmann, Eds. (Springer, 1998), chap. 4, pp. 33-49.
17. A. Rajendran, Design of preparative-supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1250**, 227-249 (2012).
18. K. Hostettmann, A. Marston, M. Hostettmann, in *Preparative Chromatography Techniques: Applications in Natural Product Isolation*, K. Hostettmann, A. Marston, M. Hostettmann, Eds. (Springer Berlin Heidelberg, 1998), chap. 7, pp. 135-201.
19. G. Gunawarda, J. McAlpine, in *Countercurrent Chromatography*, J. M. Menet, D. Thiebaut, Eds. (Taylor & Francis, 1999), chap. 8, pp. 249-271.
20. I. A. Sutherland, in *Countercurrent Chromatography: The Support-free Liquid Phase*, A. Berthod, Ed. (Elsevier Publishing Company, 2002), chap. 6, pp. 159-176.
21. L. C. Craig, O. Post, Apparatus for Countercurrent Distribution. *Analytical Chemistry* **21**, 500-504 (1949).
22. C. E. Efstathiou. ([http:// www.chem.uoa.gr/applets/AppletCraig/App1_Craig2.html](http://www.chem.uoa.gr/applets/AppletCraig/App1_Craig2.html), National and Kapodistrian University of Athens, consulté le 07/09/2015).

23. Y. Ito, M. Weinstein, I. Aoki, R. Harada, E. Kimura, K. Nunogaki, The Coil Planet Centrifuge. *Nature* **212**, 985-987 (1966).
24. A. P. Foucault, *Preface of Centrifugal Partition Chromatography*. Chromatographic Science Series (Taylor & Francis, 1994).
25. Y. Ito, Counter-current motion in counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **1372**, 128-132 (2014).
26. A. Berthod, Comments on "Counter-current motion in counter-current chromatography" by Yoichiro Ito. *Journal of Chromatography A* **1372**, 260-261 (2014).
27. A. Berthod, in *Advances in Chromatography, Volume 47*, E. Gruska, N. Grinberg, Eds. (CRC Press, 2009), chap. 10, pp. 353-444.
28. W. D. Conway, Counter-current chromatography: Simple process and confusing terminology. *Journal of Chromatography A* **1218**, 6015-6023 (2011).
29. A. Berthod, T. Maryutina, B. Spivakov, O. Shpigun, I. A. Sutherland, Countercurrent chromatography in analytical chemistry (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* **81**, 355-387 (2009).
30. A. Berthod, in *Countercurrent Chromatography: The Support-free Liquid Phase*, A. Berthod, C. L. Wilson, D. W. Wilson, G. Svehla, Eds. (Elsevier Publishing Company, 2002), chap. 1, pp. 1-20.
31. Kromaton. (www.kromaton.com, consulté le 07/09/2015).
32. C. DeAmicis, N. A. Edwards, M. B. Giles, G. H. Harris, P. Hewitson, L. Janaway, S. Ignatova, Comparison of preparative reversed phase liquid chromatography and countercurrent chromatography for the kilogram scale purification of crude spinetoram insecticide. *Journal of Chromatography A* **1218**, 6122-6127 (2011).
33. S. Antonietti, in *Chimie verte, chimie durable*. (Ellipses, 2013), chap. 1, pp. 7-29.
34. S. Sarrade, in *Quelles sont les ressources de la chimie verte ?* (EDP sciences, 2008), chap. Introduction, pp. 7-13.
35. S. Sarrade, in *Quelles sont les ressources de la chimie verte ?* (EDP sciences, 2008), chap. 4, pp. 75-96.

Chapitre 2

*Purification du carnosol par CPC :
développement de la méthode à petite
échelle*

1. Introduction

Le romarin (*Rosmarinus officinalis*) est une plante aromatique, communément utilisée dans le cadre du régime méditerranéen, et dont les propriétés cardiovasculaires ou anticancéreuses ont aujourd'hui largement été démontrées (1-9). En effet, ce végétal posséderait une puissante activité anti-oxydante liée à la présence de composés tels que l'acide rosmarinique, l'acide carnosique ou le carnosol (10-16).

Le carnosol est un composé phénolique terpénique à forte valeur ajoutée, qui reste difficile à extraire et purifier du romarin, de par sa forte instabilité en présence de chaleur, de lumière et de certains solvants (17-21). Le fort potentiel thérapeutique de cette molécule fait qu'elle est aujourd'hui très étudiée par la communauté scientifique. Ainsi, plusieurs méthodes de purification du carnosol ont pu être développées en HPLC préparative (22, 23) mais aussi en chromatographie à contre-courant (CCC) (24).

En CCC, la purification du carnosol à partir d'extraits de romarin a notamment pu être réalisée sur une bobine hydrodynamique de 325 mL en séparant avec succès des composés dont les coefficients de partage sont très proches à l'aide d'un système solvant composé d'hexane, d'acétate d'éthyle, de méthanol et d'eau (24). Cependant, comme cela est souvent le cas sur les systèmes hydrodynamiques, les temps de purification apparaissent très longs (plusieurs heures). De plus, il semble que la transposition de cette méthode sur des appareils CPC s'avère difficile, car la séparation de composés dont les coefficients de partage sont proches est toujours plus compliquée en CPC qu'en CCC. Une autre méthode de purification du carnosol à partir d'un extrait de romarin doit donc être développée en utilisant un système solvant différent afin d'obtenir des coefficients de partage plus importants.

Le développement d'une méthode en CPC est composé de plusieurs étapes, dont la plus importante mais aussi probablement la plus difficile est le choix du système solvant à utiliser (25). Les conditions généralement requises pour avoir un bon système solvant en CPC sont : (i) le ou les solutés doivent être le plus stable possible dans le système solvant, (ii) le système solvant doit posséder deux phases, si possible dans des proportions équivalentes, (iii) le système solvant doit permettre d'obtenir des coefficients de partage des solutés corrects afin de garantir leur séparation en fonction du cahier des charges et (iv) la phase stationnaire du système solvant doit pouvoir être retenue au sein de la colonne dans les conditions opératoires choisies (25). Afin de faciliter cette étape du choix d'un système solvant adéquat, des méthodologies et des règles ont pu être développées dans la littérature (25, 26).

En tout premier lieu, il conviendra de vérifier à l'aide de recherches bibliographiques si la molécule ou l'échantillon a déjà été purifié en CPC ou en CCC, afin de voir s'il est possible de réutiliser le même système solvant. Si aucun modèle n'est disponible, ou si le système solvant n'est pas utilisable, il est alors possible d'utiliser des méthodes empiriques permettant le choix du système solvant approprié (26, 27).

La première méthode qui peut être utilisée est celle du « meilleur solvant ». Elle consiste à déterminer quel solvant dissout le mieux l'échantillon ou le soluté à purifier, avant de lui ajouter un solvant plus polaire et un solvant moins polaire, généralement non miscibles, afin de créer un système biphasique. Cette méthode sera ici privilégiée car elle semble être la plus adaptée à un échantillon particulier, le système solvant étant construit en fonction de ce que l'utilisateur cherche à purifier (27). Il existe également d'autres méthodes pour le choix du système solvant telles que l'approche multi-solvant, qui consiste à utiliser des combinaisons de systèmes solvants, souvent classés en fonction de leur polarité tels que l'échelle d'Oka (26-28) ou le système Arizona (26, 27, 29). Cependant, cela revient à utiliser

des systèmes dont les proportions sont déjà fixées et dont les solvants ne sont pas forcément les plus appropriés en termes de solubilité de l'échantillon et de séparation. Plus récemment, d'autres méthodes ont pu être utilisées dans le but de choisir le système solvant approprié en estimant le coefficient de partage K_d des solutés à séparer à l'aide de logiciels tels que COSMO-RS (30) ou de modèles tels que QSAR (31).

Lorsque le choix de la nature et les proportions du système solvant ont pu être réalisés, un test en CPC peut être effectué en choisissant des conditions opératoires (vitesse de rotation, débit) permettant une bonne rétention de la phase stationnaire, une séparation conforme des solutés et une durée de purification adéquate, tout en prenant en compte les contraintes instrumentales.

La CPC est une technique avant tout préparative. Le but de son utilisation est donc de produire de grandes quantités de solutés purifiés en utilisant des colonnes dont les volumes sont toujours plus importants. Cependant, à l'image de la chromatographie préparative classique sur phase solide, il semble difficile de développer des méthodes de purification directement sur des appareils de grands volumes, tant cela peut s'avérer consommateur de temps et de solvants. Ainsi, la société Rousselet-Robatel-Kromaton a commercialisé en 2011 un appareil de faible volume (35 mL), appelé FCPC-C25, dont l'objectif est de permettre à l'utilisateur de développer une méthode sur une machine de laboratoire avant de la transférer sur une colonne de plus grand volume.

L'objet de ce chapitre consiste donc à développer de manière rapide une méthode de purification du carnosol en provenance d'un extrait de romarin sur ce CPC de petit volume dans le but de consommer peu de solvants et d'échantillon. Pour cela, avant même d'injecter l'échantillon sur le CPC, une première étape consistera à déterminer le « meilleur solvant » qui sera par la suite utilisé pour construire un système solvant biphasique approprié. Pour le développement de cette méthode de purification du carnosol, l'aspect économique sera entièrement privilégié. En plus de l'utilisation d'un rotor CPC de petit volume, les choix seront portés sur des solvants couramment utilisés en CPC des produits naturels tels que l'heptane, le butanol, le méthyl *tert*-butyl éther, le méthanol, l'éthanol ou l'eau (32-34). En effet, ces solvants sont généralement bien compris en termes de comportement au sein de la colonne et souvent peu chers.

2. Stratégie de développement en CPC

2.1. Analyse du soluté d'intérêt par HPLC

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) est une technique permettant de séparer les constituants d'un mélange. Elle est utilisée soit à petite échelle dans un but analytique, soit à grande échelle dans un but préparatif comme pour la CPC. Son principe repose sur la distribution des solutés entre une phase mobile liquide et une phase stationnaire souvent composée de particules solides de silice vierge ou greffée. L'HPLC est une technique très utilisée pour la séparation de mélanges simples ou complexes. Couplée au détecteur approprié, elle permet d'analyser des composés provenant de toutes sortes de matrices.

Le romarin ayant déjà été séparé par HPLC dans la littérature (11, 35), c'est la technique de nous utiliserons afin de mettre en évidence la présence ou non de carnosol dans les extraits choisis ainsi que

dans les fractions récoltées après purification par CPC. Pour cela, une méthode issue de la littérature (11) sera transférée sur nos appareillages selon les règles de transfert en chromatographie.

Le transfert de méthode permet de reproduire une méthode chromatographique existante d'un appareillage à un autre en gardant la même séparation. Aujourd'hui le transfert de méthode est souvent utilisé pour réduire les temps d'analyse en utilisant des appareillages plus performants (UHPLC), mais il peut aussi être tout simplement utilisé dans le cadre d'un transfert de méthode entre deux appareillages en HPLC conventionnelle. Dans tous les cas, la chimie de phase stationnaire doit rester identique.

Une méthode HPLC développée en mode gradient consiste à faire varier la composition de la phase mobile au cours de l'analyse. Le but est d'améliorer la séparation de molécules qui seraient éluées pas assez ou trop rapidement en mode isocratique, rendant la séparation des composés insuffisante. Une méthode en mode gradient est composée de plusieurs zones : des zones de palier isocratiques où la composition de la phase mobile ne varie pas et des zones de gradient dont la composition de la phase mobile évolue (Figure 12). Afin de transférer de manière correcte une méthode d'une colonne à une autre, il est important de garder certaines valeurs constantes dans ces différentes zones : pour les sections isocratiques, $\frac{t_{palier}}{t_M}$ doit rester constant, pour les sections en mode gradient, c'est $\frac{t_M}{t_G}$ qui doit rester constant, avec t_M = temps mort, t_G = temps de gradient et t_{palier} = durée du palier isocratique, prenant en compte le temps de délai.

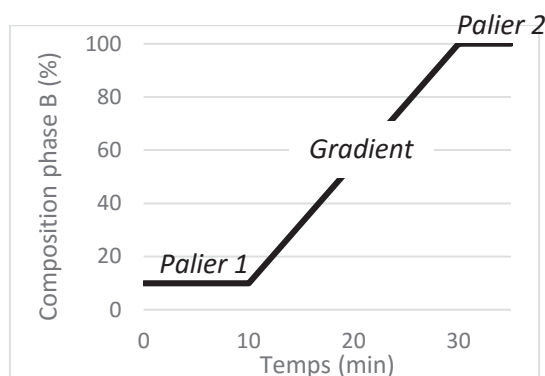


Figure 12 : Exemple de gradient d'élution. La composition initiale du système solvant est de 90% de phase A et 10 % de phase B pendant 10 minutes (palier 1). La composition évolue ensuite à 100% de phase B en 20 minutes puis reste à 100 % de phase B durant 5 minutes.

2.2. Purification du soluté d'intérêt par CPC

2.2.1. Choix du système solvant

Le développement d'une méthode par CPC et plus particulièrement la recherche d'un système solvant biphasique approprié est similaire à la démarche effectuée en chromatographie conventionnelle : ceci revient à choisir de manière simultanée une colonne contenant une phase stationnaire donnée et une phase mobile pour éluer les composés. La solubilité des composés d'intérêt dans la phase mobile mais aussi dans la phase stationnaire est un point très important en chromatographie liquide-liquide de même que le partage des solutés entre les deux phases. En effet, la CPC étant utilisée dans un but préparatif, l'utilisateur aura tout intérêt à dissoudre un maximum d'échantillon dans le système solvant afin d'en purifier la plus grande quantité possible. L'objectif de cette section est de montrer comment bien choisir un système solvant en CPC dans le but de purifier une quantité maximale de composé d'intérêt.

2.2.1.1. Recherche du « meilleur solvant »

La première étape dans la recherche d'un système solvant consiste à trouver le « meilleur solvant » (26). Pour cela, on recherche le solvant dans lequel l'échantillon et plus particulièrement le composé d'intérêt est le plus soluble. Le choix du « meilleur solvant » peut se faire de plusieurs manières : soit en recherchant la solubilité de l'échantillon ou du composé à purifier dans différents solvants dans la littérature, soit en réalisant des expériences en laboratoire, en déterminant la solubilité maximale du composé à purifier dans différents solvants. Ceci peut se faire à travers la dissolution directe du standard du composé à purifier si ce dernier est disponible, ou alors en dissolvant l'échantillon à purifier puis en l'analysant par exemple par HPLC, afin de comparer les quantités de composé d'intérêt dans le solvant. Si on ne travaille pas à partir de la plante fraîche mais plutôt à partir d'un extrait, le solvant d'extraction est souvent un bon indicateur car il est censé être celui qui permet de récupérer la plus grande quantité de solutés d'intérêt.

2.2.1.2. Composition d'un système solvant

Afin de construire un système solvant adapté à la purification que l'on souhaite réaliser, la suite de la démarche consiste à créer un système solvant biphasique pour pouvoir l'utiliser en CPC. Pour cela, il faut alors utiliser au minimum un solvant plus polaire et un solvant moins polaire, dans lesquels le « meilleur solvant » se partage. En se basant sur cette méthode, Alain Foucault a recensé de nombreux systèmes solvants ternaires auxquels il a associé le diagramme de phase, indiquant quelles proportions permettent d'avoir deux phases et pour chaque proportion, la composition des phases supérieures et inférieures (26). La Figure 13 montre un exemple de diagramme ternaire, correspondant au mélange d'un solvant miscible à deux autres solvants immiscibles.

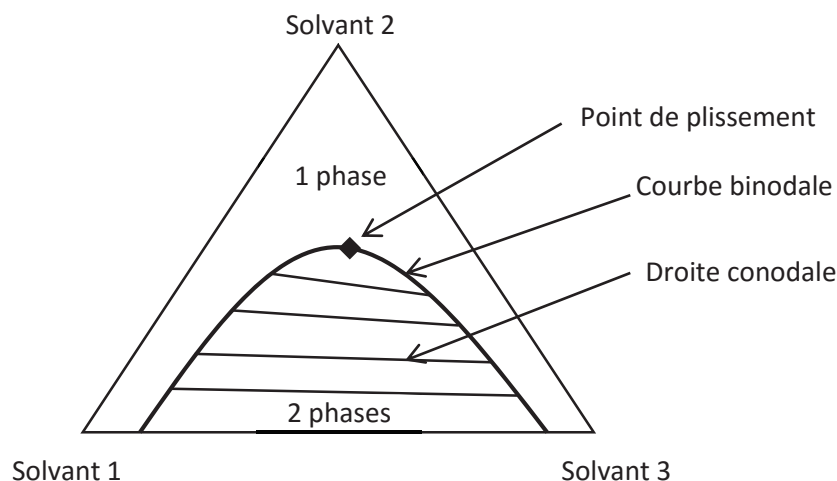


Figure 13 : Diagramme ternaire composé d'un solvant miscible (solvant 2) dans deux autres solvants non miscibles (solvants 1 et 3). La courbe binodale est la ligne de séparation entre la zone monophasique et la zone biphasique.

Tous les points qui se situent le long des droites conodales (ou *tie-lines*) donnent la même composition de phase supérieure ou inférieure mais avec un ratio de volumes différents. Lorsque l'on se rapproche du point de plissement (ou *plait point*), la composition des deux phases devient identique. La position des courbes binodales est sensible à la température, et un mélange qui a une composition proche du point de plissement peut ainsi devenir monophasique ou biphasique selon la température. Il est donc recommandé de ne pas travailler avec une composition de système trop proche du point de plissement.

Parfois l'utilisation de trois solvants ne suffit pas pour la réalisation d'une séparation adéquate par CPC. Il est alors possible d'ajouter autant de solvants que besoin, à partir du moment où le système reste biphasique. Les systèmes solvants ternaires et quaternaires restent les systèmes les plus utilisés car ils sont relativement simples à mettre en place. Certains utilisateurs sont amenés à travailler avec plus de solvants lorsque leur séparation n'est pas suffisante. Dans tous les cas avant de changer ou de rajouter un solvant, l'utilisateur doit penser à modifier les proportions des solvants entre eux au sein du système afin d'essayer de changer la sélectivité des composés (modification des interactions moléculaires soluté-système biphasique, modifiant la rétention du composé) et ainsi d'affiner la séparation.

Une fois le système solvant construit, il faut ensuite vérifier que l'on peut l'utiliser. Avant de réaliser des essais en CPC, l'utilisateur peut tester le système solvant avec l'échantillon à purifier en calculant les coefficients de partage théoriques des solutés à séparer dans le but d'estimer la qualité de séparation des composés. Ceci peut s'effectuer grâce à la méthode du shake-flask.

2.2.2. Calcul des coefficients de partage théoriques par shake-flask

La méthode du shake-flask (ou flacon agité) consiste à déterminer le coefficient de partage théorique d'un ou de plusieurs solutés dans un système solvant donné, dans le but de voir si ce dernier est approprié ou non pour la séparation des composants d'un échantillon.

En CPC, le coefficient de partage d'un soluté dans un système biphasique est donné par l'Équation 7 :

$$K_d = \frac{[\text{soluté}]_S}{[\text{soluté}]_M} \quad \text{Équation 7}$$

Avec [soluté] = concentration du soluté dans la phase stationnaire (S) et dans la phase mobile (M). À noter ici que la phase stationnaire peut être soit la phase supérieure si le système solvant est utilisé en mode descendant, soit la phase inférieure s'il est utilisé en mode ascendant.

En pratique, une petite quantité de l'échantillon à purifier est versée dans un flacon contenant des proportions égales de phase stationnaire et de phase mobile. Le flacon est ensuite fermé et secoué vigoureusement afin de dissoudre les composés et de les laisser se partager entre les deux phases. Les phases contenant les solutés en partage sont ensuite séparées puis analysées par HPLC ou par chromatographie couche-mince. En HPLC, si l'effet matrice de l'échantillon est considéré comme négligeable, il est possible d'estimer le coefficient de partage théorique des solutés directement par le rapport de leurs aires :

$$K_{d \text{ théorique}} = \frac{\text{Aire pic soluté}_S}{\text{Aire pic soluté}_M} \quad \text{Équation 8}$$

Les coefficients de partage théoriques $K_{d \text{ théorique}}$ sont ensuite comparés. Le soluté à purifier doit généralement avoir un coefficient de partage compris entre 0,1 et 10 et préférentiellement différent des autres afin qu'il ait une chance d'être séparé. Dans la mesure du possible, la sélectivité α entre deux composés ($\alpha = K_{d2}/K_{d1}$ avec $K_{d2} > K_{d1}$) doit être supérieure à 1,5 (25) mais elle est généralement difficile à évaluer sur les nombreux composés présents lors de la purification de produits naturels.

3. Matériel et méthodes

3.1. Liste des produits chimiques utilisés

Les différents produits chimiques utilisés dans ce chapitre sont listés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Liste des produits chimiques utilisés

Produits chimiques	CAS	Fournisseur	Pureté
Heptane	142-82-5	Sigma Aldrich	≥ 99 %
Méthanol	67-56-1	Sigma Aldrich	≥ 99,9 %
Méthyl t-butyl éther	1634-04-4	Sigma Aldrich	≥ 99,0 %
Ethanol	64-17-5	Sigma Aldrich	≥ 96 %
1-Butanol	71-36-3	Sigma Aldrich	≥ 99,7 %
Acétonitrile	75-05-8	Sigma Aldrich	≥ 99,9 %
New coccine red	2611-82-7	Sigma Aldrich	75 %
β-carotène	7235-40-7	Sigma Aldrich	≥ 97 %
Extrait fluide romarin	-	Cooper industries	-
Extrait sec romarin	-	Cooper industries	-
Carnosol	5957-80-2	Phytolab	≥ 90 %
Acide carnosique	3650-09-7	Phytolab	≥ 90 %
Acide rosmarinique	20283-92-5	Phytolab	≥ 95 %

3.2. HPLC

3.2.1. Instrumentation

La méthode d'analyse HPLC est réalisée dans nos laboratoires sur une HPLC Alliance Waters 2690 équipée d'un détecteur UV à barrette de diodes sur laquelle est montée une colonne Agilent technologies Zorbax SB-Aq 3x150 mm, 5µm. La colonne Zorbax SB-Aq est une colonne phase inverse greffée alkyle principalement conçue pour retenir des composés hydrophiles lors de l'utilisation de phases mobiles aqueuses.

3.2.2. Préparation des échantillons

Les deux extraits de romarin du commerce n'étant pas sous la même forme, chacun est préparé de manière différente.

L'extrait fluide est dilué par 100 dans de l'eau Elga avant injection.

Pour l'extrait sec, 1g est pesé et mis en contact avec 10 mL de méthanol. Après avoir été laissé 15 minutes aux ultrasons, l'extrait est laissé une nuit en contact avec le méthanol. Le lendemain, l'extrait est centrifugé à 5000 rpm durant 10 minutes et le surnageant récupéré afin de se séparer des parties non dissoutes. L'extrait est alors dilué par 100 dans de l'eau Elga avant d'être injecté.

Les standards de carnosol et d'acide rosmarinique sont préparés à 250 µg/mL dans du méthanol. Le standard d'acide carnosique est quant à lui préparé à 170 µg/mL de méthanol.

3.2.3. Analyse des échantillons

En accord avec les caractéristiques de la colonne (cf. Tableau 6 p. 39), cette dernière est utilisée à un débit de 0,4 mL/min. Le volume d'injection de chaque échantillon est de 20 µL. La longueur d'onde de détection est fixée à 214 nm.

3.3. Shake-flask

Pour chaque système solvant testé, la préparation des échantillons est exécutée comme suit : 400 mg d'extrait de romarin fluide ou sec est pesé et transféré dans un flacon contenant 2 mL de phase supérieure et 2 mL de phase inférieure du système solvant à tester pour la purification. Le flacon est ensuite vigoureusement agité puis placé 15 minutes aux ultrasons afin de dissoudre la plus grande quantité possible de solutés. Les deux phases sont ensuite séparées et centrifugées à 5000 rpm durant 2 minutes afin de regrouper au fond du tube les composés non solubles dans le système solvant. Chaque phase contenant les solutés est ensuite prélevée et diluée par 10 avec la même phase vierge avant d'être injectée en HPLC, en utilisant la même méthode que celle développée pour l'analyse des extraits. Un blanc de chaque phase est injecté en amont afin de vérifier qu'aucun pic de solvant n'apparaît sur le chromatogramme HPLC ou si un pic apparaît, qu'il puisse être assimilé au solvant et non à une impureté. Les aires des pics chromatographiques des différents solutés contenus sur le chromatogramme sont ensuite calculées à l'aide du logiciel Azur (Datalys).

3.4. Chromatographie de Partage Centrifuge

3.4.1. Instrumentation

Le rotor utilisé dans le cadre du développement de méthode de purification du romarin est un rotor Kromaton (Rousselet-Robatel, Annonay, France) de 35 mL monté sur un bâti FCPC-A.

Un refroidisseur F10-C Julabo (Colmar, France) est branché au système afin de réfrigérer la chambre du rotor et ainsi empêcher de fortes variations de températures. En effet, la rotation appliquée au système peut créer des échauffements au niveau des raccords rotatifs pouvant induire une augmentation de température du système solvant et donc une modification de la composition de ce dernier. Ceci peut alors avoir pour effet une variation du taux de phase stationnaire dans la colonne ainsi qu'une modification des coefficients de partage des composés ayant pour conséquence directe une modification de leur séparation.

Le système de pompage et de détection est assuré par un Spot Prep II Armen Instrument (Saint-Avé, France). Il comprend une pompe quaternaire (débits applicables compris entre 1 et 250 mL, avec une pression maximale de 230 bar). Le système est équipé d'une vanne d'injection automatique sur laquelle est montée une boucle de 10 mL. L'appareil est doté d'un système de détection UV double longueur d'onde fixée à 210 et 254 nm. L'emploi d'un collecteur de fraction est également possible sur cet instrument, mais ne sera pas utilisé dans le cadre du développement de méthode de purification. Le contrôle de l'appareil et l'acquisition des données est assuré par le logiciel Armen Glider Prep.

3.4.2. Utilisation de l'appareil de CPC

Au début de chaque journée d'utilisation de l'appareil de CPC, le refroidisseur est mis en route et réglé à 0°C. Lors d'un changement de système solvant, le rotor est rincé avec les deux phases du nouveau système pour évacuer toutes traces de l'ancien. Le rinçage est effectué à faible vitesse de rotation (600 rpm) afin de répartir les solvants de manière homogène dans les cellules circulaires et canaux du rotor via la force de Coriolis.

Pour une expérience donnée, le rotor est ensuite entièrement chargé en phase stationnaire, toujours à 600 rpm. Une vitesse de rotation appropriée est ensuite appliquée, puis la phase mobile est pompée à travers la phase stationnaire au débit qui sera ensuite utilisé pour l'élution afin d'équilibrer la colonne. La phase mobile pousse alors l'excédent de phase stationnaire non retenue. Lorsque l'équilibre est atteint, il n'y a plus que de la phase mobile qui sort de la colonne, la ligne de base devient généralement stable.

Le taux de phase stationnaire est calculé soit par déplacement (collecte et mesure de la quantité de phase stationnaire non retenue dans la colonne pour en déduire la quantité de phase mobile contenue dans la colonne), soit par injection d'un composé non retenu indiquant directement le volume mort ou volume de phase mobile dans la colonne. Ainsi, en connaissant le volume de la colonne, il est possible d'en déduire la proportion de phase stationnaire contenue dans le rotor aux conditions opératoires choisies.

3.4.3. Préparation et injection de l'extrait de romarin

5 g d'extrait sec de romarin sont introduits dans 10 mL de phase supérieure ou inférieure du système solvant de manière à extraire le plus de carnosol possible, puis mis aux ultrasons durant 10 minutes afin de solubiliser une quantité maximale de composés. L'échantillon est ensuite centrifugé à 5000 rpm durant 3 min afin de décanter les composés non solubles au fond du tube et de récupérer la partie supérieure contenant les molécules solubilisées.

La colonne de CPC est ensuite chargée en phase stationnaire puis équilibrée à vitesse de rotation et débits choisis. Lorsque la ligne de base est stable, 1 mL d'extrait de romarin est injecté. La longueur d'onde de détection est fixée à 210 nm. Une seconde longueur d'onde de 254 nm est laissée par défaut sur le détecteur. En fin d'élution, une extrusion est réalisée. Elle consiste à pomper de la phase stationnaire à la place de la phase mobile afin de faire sortir les composés très, voire infiniment retenus, et donc de rincer la colonne.

4. Résultats et discussion

Comme indiqué en introduction, l'objectif est de développer une méthode CPC permettant de purifier du carnosol, molécule aux nombreuses propriétés thérapeutiques, à partir d'un extrait de romarin. Avant même de développer la méthode, il est important de mettre en évidence la présence de cette molécule dans les extraits sélectionnés. Ceci est réalisé par HPLC après transfert d'une méthode provenant de la littérature. Le système solvant approprié est ensuite déterminé à l'aide des méthodes du « meilleur solvant » et du shake-flask. Les systèmes solvant apparaissant comme encourageants sont ensuite transférés en CPC. L'objectif ici est de purifier le carnosol avec un taux de récupération et une pureté de 100% (retour à la ligne de base entre le pic de carnosol et les impuretés environnantes).

4.1. Mise en évidence du carnosol dans un extrait de romarin du commerce par HPLC

Lors de la réalisation de la purification d'extrait naturels en CPC ou toute autre technique de purification, une première étape très importante à prendre en compte est l'extraction solide-liquide. Il s'agit de mettre en contact la plante préalablement broyée avec un solvant d'extraction afin d'en récupérer un ou plusieurs composés solubles (36). Cette extraction, lorsqu'elle est optimisée permet de récupérer un maximum des molécules que l'on souhaite purifier. Elle n'est donc pas à négliger car il est toujours plus intéressant de travailler avec des extraits riches en composés que l'on souhaite purifier afin d'avoir la possibilité de produire toujours plus. L'extraction de solutés dans les plantes n'étant pas un sujet maîtrisé au sein du laboratoire, nous avons choisi ici de nous en affranchir en achetant directement des extraits de romarin vendus dans le commerce dans lesquels nous chercherons à purifier le carnosol.

Deux extraits de feuilles de *Rosmarinus officinalis* sont achetés dans le commerce : un extrait fluide et un extrait sec. L'extrait fluide a été obtenu par macération dans de l'éthanol à 30 % à froid pour éviter toute altération des composés actifs. Le rapport plante/extrait est de 1/1, c'est-à-dire qu'avec 1 kg de

plante est fabriqué 1 kg d'extrait. L'extrait sec est quant à lui fabriqué de la même manière par macération, à laquelle s'ajoute une étape d'évaporation des solvants d'extraction par dessiccation sous vide partiel à 45/50°C. Le rapport plante/extrait est ici de 5/1.

La première étape consiste à vérifier par HPLC que ces extraits contiennent bien la molécule à purifier : le carnosol. Pour cela, la méthode d'analyse HPLC doit être développée de manière à pouvoir facilement déterminer la présence ou non de carnosol et quantifier cette molécule. Deux autres composés seront également recherchés et identifiés sur le chromatogramme HPLC, l'acide carnosique et l'acide rosmarinique, antioxydants très souvent étudiés dans le romarin (9, 11-21, 35, 37-42).

4.1.1. Transfert de la méthode HPLC

4.1.1.1. Méthode de référence

La méthode d'analyse HPLC utilisée pour la mise en évidence du carnosol est une méthode transférée depuis la publication : « Antiprolifération effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on human ovarian cancer cells *in vitro* » (11). Cette méthode a été développée sur un appareil Agilent 1100 monté d'une colonne Zorbax SB-C18 4,6 x 150 mm avec un diamètre de particules de 3,5 µm. Les phases mobiles utilisées sont une phase A composée d'eau acidifiée par 0,1% d'acide formique et une phase B composée d'acétonitrile auquel ont également été ajoutés 0,1% d'acide formique. Le gradient utilisé est visible Tableau 2.

Tableau 2 : Méthode d'analyse HPLC des constituants du Romarin (11) à transférer dans nos laboratoires.

Temps (min)	% Acétonitrile (B)
0	10
2	10
26	24
66	100
72	100

Le chromatogramme obtenu à l'aide de cette méthode de référence lors de la séparation des constituants d'un extrait éthanolique à 70% est visible en Figure 14.

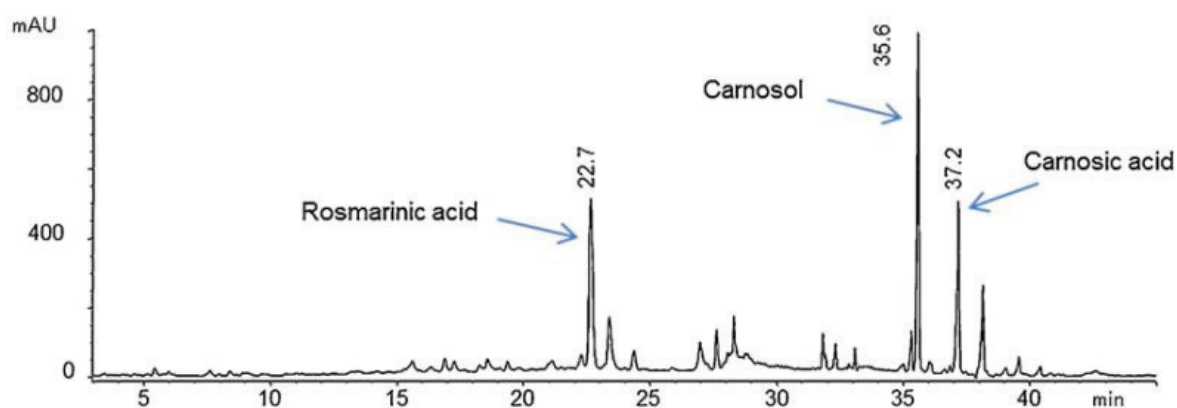


Figure 14 : Chromatogramme HPLC d'un extrait éthanolique à 70% de Romarin à 210 nm (11). Gradient décrit Tableau 2. HPLC Agilent 1100, colonne Zorbax SB-C18 4,6 x 150 mm, dp = 3,5 μ m. $t_{R \text{ carnosol}} = 35,6$ minutes.

En prenant en compte le temps de délai, le temps mort et l'évolution de la composition de la phase mobile en fonction du temps (Tableau 2), il est possible de calculer la composition à l'élution des trois composés identifiés sur le chromatogramme : l'acide rosmarinique sort à une composition de 20,3 % d'acétonitrile, le carnosol à 36,5 % et l'acide carnosique à 39,6 %.

La méthode de référence comporte 4 zones : un palier isocratique initial, deux pentes de gradient, et un palier isocratique final permettant de rincer la colonne. Comme défini par les règles de transfert, il est nécessaire de calculer les constantes $\frac{t_{\text{palier}}}{t_M}$ ou $\frac{t_M}{t_G}$ pour chaque zone (Tableau 3).

Tableau 3 : Valeurs à garder constantes dans les différentes zones de la méthode initiale à transférer dans nos laboratoires.

N° zone	Durée	Type zone	Rapport à garder constant	Valeur du rapport	Remarque
Zone 1	2 min	Palier isocratique	$\frac{t_{\text{palier}}}{t_M}$	1,61	Prendre en compte le temps de délai
Zone 2	24 min	Gradient	$\frac{t_M}{t_G}$	$8,04 \cdot 10^{-2}$	
Zone 3	40 min	Gradient	$\frac{t_M}{t_G}$	$4,83 \cdot 10^{-2}$	
Zone 4	6 min	Palier isocratique	-	-	Rinçage de la colonne = $3 V_M$
Total	72 min				

4.1.1.2. Transfert de la méthode de séparation du romarin sur notre appareillage

La colonne SB-Aq utilisée pour le transfert de la méthode d'analyse dans nos laboratoires possède une chimie de surface légèrement différente de la colonne SB-C18 utilisée pour la méthode initiale. Cette différence de composition peut avoir une influence sur la sélectivité des composés et donc engendrer une différence de composition de phase mobile à la sortie des composés.

Les phases mobiles utilisées sont les mêmes que celles utilisées sur la méthode initiale à la différence que l'acide formique ($pK_a = 3,75$ à 25°C) sera remplacé par de l'acide acétique ($pK_a = 4,76$ à 25°C) pour cause de disponibilité au moment du transfert de la méthode.

D'après la valeur des constantes calculées sur la méthode de départ (Tableau 3), les durées de chaque étape du nouveau gradient sont calculés. Le nouveau gradient est composé d'un premier palier de 0,5 minutes à 10% d'acétonitrile puis d'un premier gradient de 10 à 24% d'acétonitrile en 23 minutes, un second gradient de 24 à 100% d'acétonitrile en 38 minutes puis d'un dernier palier de 6 minutes à 100% acétonitrile (Tableau 4).

Tableau 4 : Nouveau gradient à utiliser dans nos laboratoires sur HPLC Alliance Waters, colonne Agilent technologies Zorbax SB-Aq 3x150 mm, $dp = 5\mu\text{m}$, débit = 0,4 mL/min.

Temps (min)	% Acétonitrile (B)
0	10
0,5	10
23,5	24
61,5	100
67,5	100

4.1.1.3. Injection des standards

Afin de déterminer les temps de rétention et le spectre UV des composés, les standards d'acide rosmarinique, de carnosol et d'acide carnosique sont injectés en HPLC (Figure 15). Le temps de rétention de l'acide rosmarinique est de 22,8 min, 41,6 min pour le carnosol et 43,5 min pour l'acide carnosique. La composition de la phase mobile à l'élution est de 20,9 % pour l'acide rosmarinique, 51,5 % pour le carnosol et 55,3 % pour l'acide carnosique. Ces compositions à l'élution sont très différentes de celles constatées dans le cas de la méthode initiale. Ceci peut être dû à la différence de composition entre les phases stationnaires ou la possible différence de pH entre la méthode initiale et la méthode transférée à l'ISA.

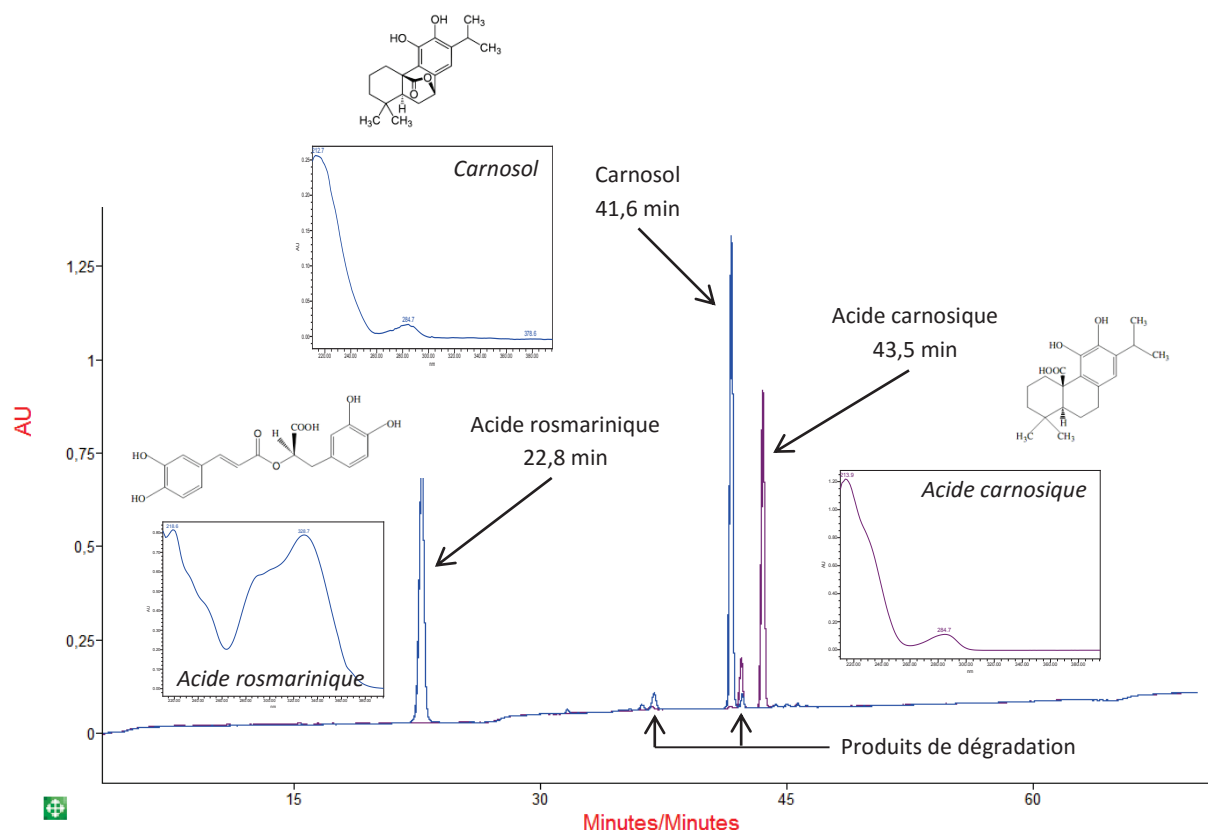


Figure 15 : Superposition des injections HPLC d'un mélange acide rosmarinique à 250 µg/mL + carnosol à 250 µg/mL (en bleu) et du standard d'acide carnosique à 170 µg/mL (en violet). F = 0,4 mL/min, Vinj = 20 µL, gradient phase mobile A = eau + 0,1% acide acétique à B = acétonitrile + 0,1% acide acétique, détection UV à 214 nm. Spectres UV des composés réalisés de 210 à 400 nm.

4.1.1.4. Diminution de la durée de la méthode

L'observation des chromatogrammes Figure 15 montre que le dernier composé d'intérêt, l'acide carnosique sort à 43,5 minutes alors que la méthode dure plus de 67 minutes. Il y a donc possibilité d'optimiser la méthode afin de raccourcir le temps d'analyse. Pour cela, les deux premières pentes de gradient sont gardées telles quelles, à la différence que la pente entre 23,5 et 61,5 min est raccourcie pour passer rapidement à 100 % acétonitrile au moment de la sortie du dernier pic d'intérêt, l'acide carnosique dont le temps de rétention est de 43,5 min (Tableau 5). La pente de 2 %/min est donc gardée entre 23,5 min et 43,5 min avec une évolution de la proportion en acétonitrile de 24 % à 64 %. Le taux d'acétonitrile passe ensuite à 100% en 0,5 min avant la réalisation du palier de rinçage de 6 minutes.

L'injection des trois standards acide rosmarinique, carnosol et acide carnosique est réalisée de la même manière que dans le § 4.1.1.3, afin de vérifier qu'il n'y a aucune modification des temps de rétention. Ces derniers étant identiques à la méthode précédente (Tableau 4) la méthode optimisée est validée.

Le Tableau 6 permet de comparer les colonnes et les paramètres utilisés lors de la méthode initiale et des deux méthodes transférées à l'ISA.

Tableau 5 : Méthode améliorée à utiliser dans nos laboratoires sur HPLC Alliance Waters, colonne Agilent technologies Zorbax SB-Aq 3x150 mm, dp = 5µm, débit = 0,4 mL/min.

Temps (min)	% Acétonitrile (B)
0	10
0,5	10
23,5	24
43,5	64
44	100
50	100

Tableau 6 : Tableau de transfert : comparaison des colonnes et des paramètres utilisés.

		Méthode initiale (11)	Méthode transférée au laboratoire ISA	Méthode améliorée
Colonne	Type colonne	Zorbax-SB C18	Zorbax SB-Aq	
	Longueur colonne	150 mm	150 mm	
	Diamètre colonne	4,6 mm	3 mm	
	Diamètre des particules	3,5 µm	5 µm	
Paramètres	Volume mort	1,74 mL	0,74 mL	
	Débit	0,9 mL/min	0,4 mL/min	
	Temps mort	1,93 min	1,85 min	
	Temps de délai	1,11 min	2,5 min	
Durée	t _{palier1}	2 min	0,5 min	0,5 min
	t _{gradient1}	24 min	23 min	23 min
	t _{gradient2}	40 min	38 min	20 min
	t _{gradient3}	-	-	0,5 min
	t _{palier rinçage}	6 min	6 min	6 min
Temps de rétention t _R des standards	Acide rosmarinique	22,7 min	22,8 min	
	Carnosol	35,6 min	41,6 min	
	Acide carnosique	37,2 min	43,5 min	
Composition à l'élution (% acétonitrile)	Acide rosmarinique	20,3 %	20,9 %	
	Carnosol	36,5 %	51,5 %	
	Acide carnosique	39,6 %	55,3 %	
Durée totale d'analyse		72 min	67,5 min	50 min

Le Tableau 6 montre que le temps d'analyse a été raccourci de 4,5 minutes entre la méthode initiale et la méthode transférée au laboratoire ISA puis encore de 17,5 minutes entre les deux méthodes ISA. Les standards d'acide rosmarinique, carnosol et acide carnosique gardent les mêmes temps de rétention et composition à l'élution entre les deux méthodes ISA. On remarque une différence de composition à l'élution des 3 standards entre la méthode issue de la littérature et les deux méthodes ISA. L'explication la plus plausible semble être une différence de phase stationnaire entre les deux colonnes ou une éventuelle différence de pH entre la méthode initiale et la méthode transférée à l'ISA.

Les temps de rétention des différents standards étant connus, les extraits de romarin peuvent être injectés afin d'analyser leur composition en solutés d'intérêt.

4.1.2. Analyse HPLC des extraits

Les deux extraits du commerce (extrait fluide et extrait sec) sont injectés en HPLC afin de vérifier la présence ou non du carnosol et éventuellement celle de l'acide rosmarinique et de l'acide carnosique.

La détermination de la présence de carnosol mais aussi d'acide rosmarinique et d'acide carnosique est effectuée en superposant les chromatogrammes des standards et des extraits et en réalisant une comparaison des spectres UV entre les pics de standards et les pics des extraits apparaissant aux mêmes temps de rétention. L'analyse des extraits de romarin (Figure 16) montre la présence de très nombreuses molécules. L'analyse de l'extrait sec (en violet) montre que l'échantillon comporte de l'acide rosmarinique et du carnosol alors qu'il ne comporte pas (ou très peu) d'acide carnosique. Tandis que l'acide rosmarinique n'est pas très bien séparé des pics environnants, le carnosol apparaît résolu ($R_s = 1,73$). L'analyse de l'extrait fluide (en vert) montre que l'extrait fluide comporte de l'acide rosmarinique mais pas (ou très peu) de carnosol, ni d'acide carnosique. L'acide rosmarinique apparaît également mal résolu comme dans le cas de l'extrait sec.

L'absence de carnosol dans l'extrait fluide peut s'expliquer par une légère dégradation du composé en présence d'éthanol (17). Cette dégradation n'est pas ou moins observée dans l'extrait sec car l'éthanol a été évaporé après extraction solide-liquide. Concernant l'acide carnosique, ce dernier se dégrade également en présence d'éthanol et cette fois-ci beaucoup plus fortement (17). Ainsi, il est tout à fait possible que l'acide carnosique se soit dégradé dans l'extrait fluide mais aussi avant même l'évaporation de l'éthanol lors de la macération de l'extrait sec.

L'HPLC permet donc bien ici de séparer et de détecter correctement le carnosol. Ce dernier est présent dans l'extrait sec mais pas dans l'extrait fluide. La purification du carnosol sera donc faite sur le seul échantillon en contenant : l'extrait sec.

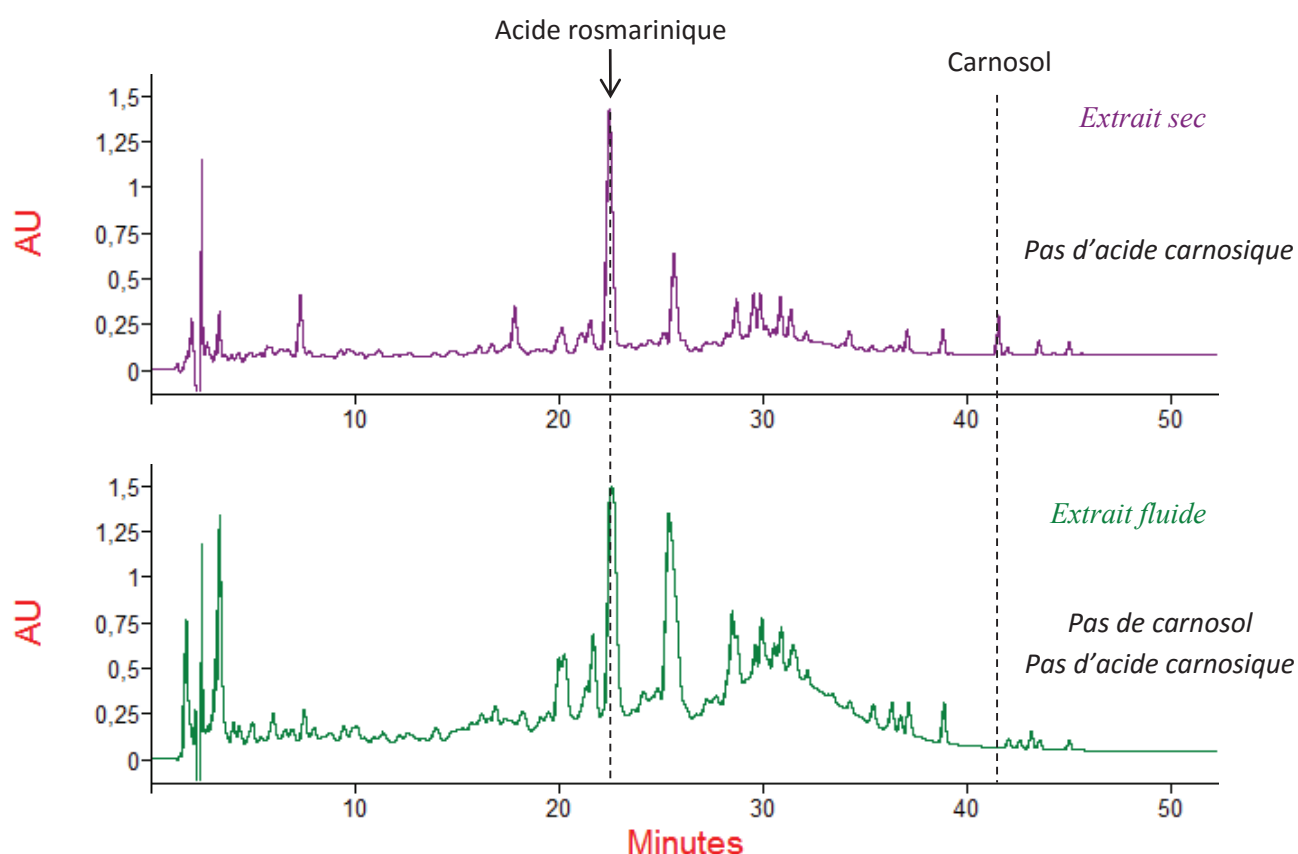


Figure 16 : Injection HPLC de l'extrait sec de romarin (en violet), dissous dans du méthanol puis dilué dans de l'eau et de l'extrait fluide (en vert) dilué dans de l'eau. F = 0,4 mL/min, Vinj = 20 µL, gradient phase mobile A = eau + 0,1% acide acétique à B = acétonitrile + 0,1% acide acétique, détection UV à 214 nm.

4.2. Développement de la méthode CPC

4.2.1. Recherche du « meilleur solvant »

Le carnosol étant un composé coûteux (16€/mg), la recherche du bon solvant sera effectuée à travers la littérature. De nombreux solvants ont été testés et parfois comparés dans le but d'extraire le carnosol du romarin ou de la sauge (12, 13, 15, 18, 19, 35, 42). Koudous et al. (42) ont par exemple comparé les capacités d'extraction du carnosol dans 10 g de sauge durant 24 h par 5 solvants différents : l'éthanol, l'acétone, l'acétate d'éthyle, l'hexane et l'eau (Figure 17). Ils ont notamment montré que l'eau et l'hexane semblent être à exclure. En effet, le carnosol n'est que très peu soluble dans ces deux derniers alors qu'il est beaucoup plus soluble dans l'éthanol. L'éthanol semble donc correspondre à un bon solvant de dissolution. Le méthanol étant également beaucoup utilisé dans la littérature en tant que solvant d'extraction, il pourra être choisi comme bon solvant. Attention cependant à ne pas laisser l'extrait trop longtemps en contact de l'éthanol et du méthanol, ces derniers provoquant à long terme la dégradation des composants du romarin (17, 20, 21).

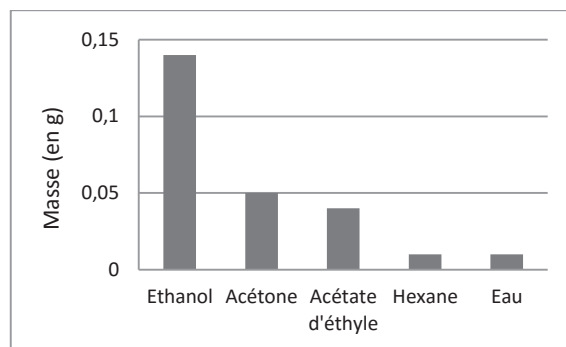


Figure 17 : Quantités de carnosol après extraction de 10 g de Sauge durant 24h dans 5 solvants différents : éthanol, acétone, acétate d'éthyle, hexane et eau (42).

Les « bons solvants » ayant été choisis, des systèmes solvants biphasiques doivent être construits en y associant des solvants plus polaires et des solvants moins polaires selon la méthode développée par Foucault (26). L'hexane, l'eau, l'acétone et l'acétate d'éthyle étant un minimum solubilisant pour le carnosol, ils pourront être utilisés dans la construction du système biphasique. A noter que devant sa toxicité pour l'homme, l'hexane ne sera pas utilisé mais remplacé ici par un solvant légèrement moins dangereux pour la santé mais aux propriétés similaires : l'heptane (43).

En partant de l'éthanol ou du méthanol en tant que « meilleur solvant », 24 systèmes solvants ont été construits, testés par shake-flask puis pour certains testés en CPC lorsque les résultats s'avéraient encourageants. Deux exemples de systèmes solvants ayant abouti à un essai en CPC seront présentés ici : le système solvant butanol/méthanol/eau en proportions 5/1/4 (v/v) et le système heptane/méthyl *tert*-butyl éther/éthanol/eau en différentes proportions.

4.2.2. Système butanol/méthanol/eau 5/1/4

4.2.2.1. Construction du système solvant

Le carnosol étant un composé à polarité intermédiaire (44), l'utilisation d'un système plutôt polaire (26) tel que le système butanol/méthanol/eau peut être intéressant. Ce système solvant est un système biphasique bien connu car étudié à travers le tracé d'un diagramme ternaire par Foucault dans son livre dédié à la CPC (26). Ce diagramme correspond au mélange du méthanol, miscible à deux autres solvants immiscibles (le butanol et l'eau).

La composition du système solvant butanol/méthanol/eau a été orientée vers des proportions 5/1/4 (v/v). Ces dernières ont été choisies pour avoir : (i) des volumes simples à mesurer lors de la création du système solvant ; (ii) un maximum de méthanol possible, considéré ici comme le « meilleur solvant », tout en ayant deux phases ; (iii) le moins d'eau possible, le carnosol y étant très peu soluble ; (iv) et en gardant des quantités de phases supérieure et inférieure les plus égales possibles. Le système solvant butanol/méthanol/eau en proportions 5/1/4 (v/v) comporte une phase supérieure composée de 65% de butanol, 9% de méthanol et 26% d'eau. La phase inférieure est quant à elle composée de 10% de butanol, 12,5% de méthanol et 77,5% d'eau (Figure 18). La quantité initiale de méthanol n'a pas été augmentée au-delà de 10% pour ne pas s'approcher trop près du point de plissement et de la courbe binodale.

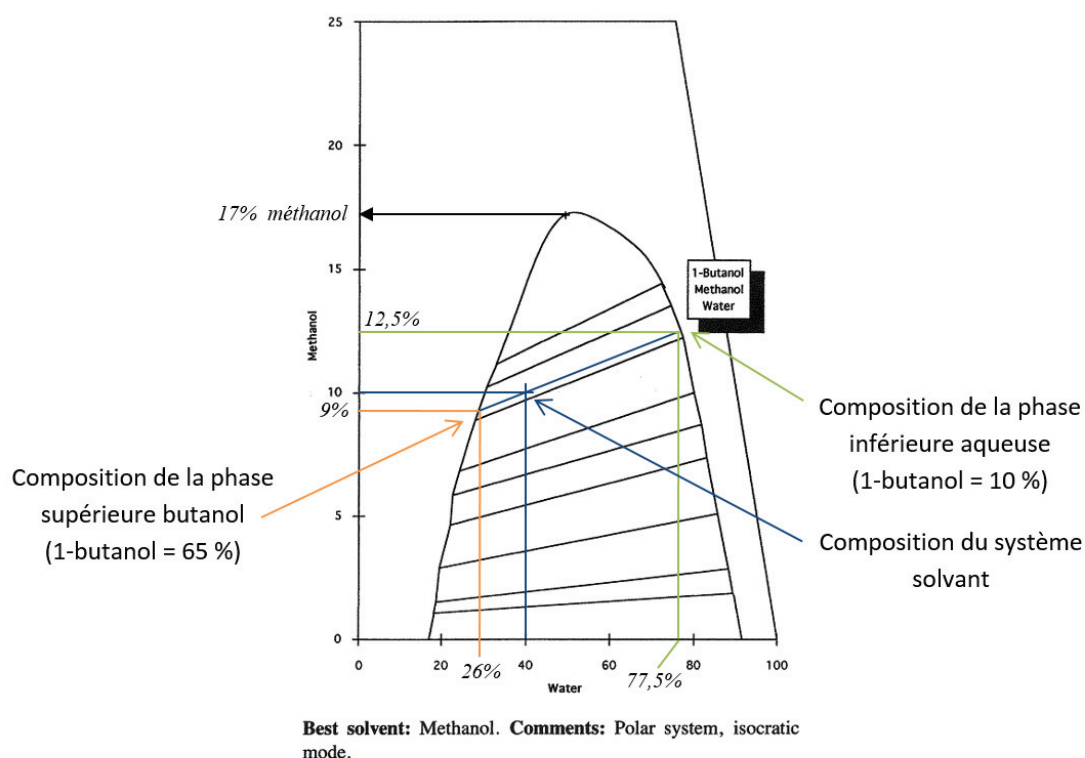


Figure 18 : Diagramme ternaire du système solvant 1-butanol/méthanol/eau. Afin d'avoir un système solvant composé de deux phases, la proportion de méthanol ne doit pas excéder 17%.

4.2.2.2. Test du système solvant par shake-flask

Un shake-flask est réalisé comme indiqué au §3.3. Le résultat des analyses HPLC des phases supérieures et inférieures est visible Figure 19.

L'observation des chromatogrammes montre qu'il y a plus de carnosol dans la phase supérieure (en bleu) tandis que la quantité d'acide rosmarinique contenue dans les phases supérieures et inférieures semble presque identique. Les coefficients de partage de l'acide rosmarinique, du carnosol et des composés à polarité proche du carnosol (probables interférents) sont calculés dans les deux modes (ascendant ou descendant) (Tableau 7).

Pour une utilisation du système solvant butanol/méthanol/eau en mode ascendant, les coefficients de partage théoriques des composés semblent très proches. Il y a un fort risque pour que, quel que soit le taux de phase stationnaire, le carnosol ($K_{d_{théorique}} = 0,10$) ne soit pas séparé d'un grand nombre d'autres molécules ($K_{d_{théoriques}} = 0,16 ; 0,17 ; 0,19 ; 0,21 ; 0,23$). Ce système solvant ne sera donc pas testé en CPC en mode ascendant. Dans le cas de l'utilisation du système solvant butanol/méthanol/eau 5/1/4 (v/v) en mode descendant, les coefficients de partage des composés s'inversent et apparaissent beaucoup plus éloignés. Un test de séparation peut donc être réalisé en CPC.

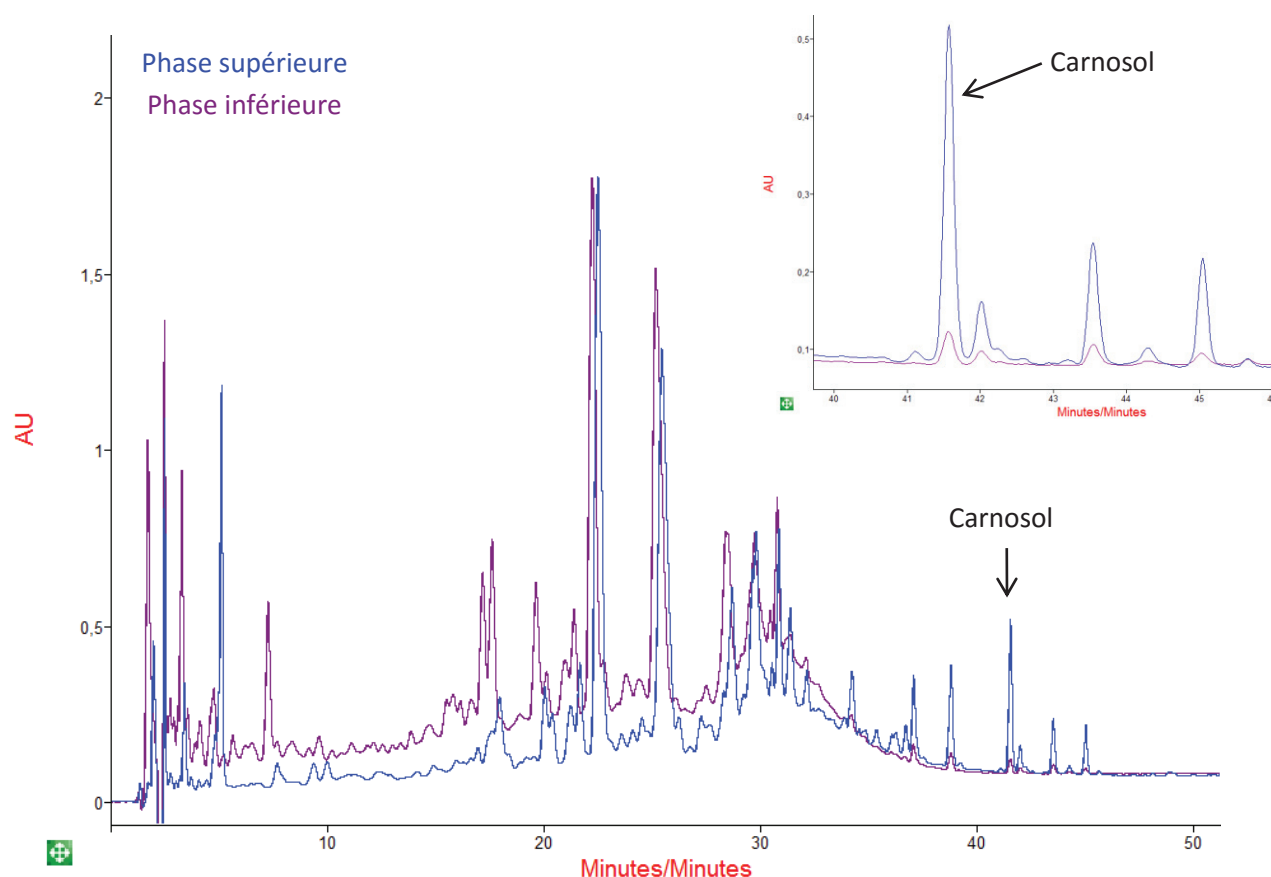


Figure 19 : Chromatogramme HPLC des phases supérieures et inférieures lors d'un shake-flask sur le système solvant butanol/méthanol/eau 5/1/4 (v/v). En insert, zoom sur les temps de rétention entre 40 et 50 minutes. Conditions opératoires § 3.2.3 et gradient utilisé en Tableau 6.

Tableau 7 : Coefficients de partage théoriques de l'acide rosmarinique, du carnosol et des pics compris entre 37 et 46 minutes par analyse HPLC des phases supérieures et inférieures du système butanol/méthanol/eau en proportions 5/1/4 (v/v).

Composé	Temps rétention (min)	Aire du pic en phase supérieure	Aire du pic en phase inférieure	$K_{d\text{théorique}}^{\text{ascendant}} = \frac{\text{phase stationnaire inférieure}}{\text{phase stationnaire supérieure}}$	$K_{d\text{théorique}}^{\text{descendant}} = \frac{\text{phase stationnaire supérieure}}{\text{phase stationnaire inférieure}}$
Acide rosmarinique	22,50	2086	2162	0,96	1,04
	37,08	39	169	0,23	4,37
	38,82	34	199	0,17	5,90
Carnosol	41,55	27	265	0,10	9,98
	42,00	11	53	0,21	4,79
	43,55	19	97	0,19	5,20
	45,02	11	83	0,14	7,20

4.2.2.3. Test du système solvant en mode descendant

Le système solvant butanol/méthanol/eau 5/1/4 (v/v) est testé en CPC en mode descendant. Dans ce mode d'utilisation, la phase mobile est principalement aqueuse.

La première phase consiste à mettre en place des conditions opératoires afin de retenir un maximum de phase stationnaire et permettant ainsi la réalisation d'une séparation. Pour cela, plusieurs conditions opératoires seront testées et les taux de phase stationnaire calculés. A l'aide des coefficients de partage théoriques, une estimation des volumes de rétention et donc des temps de rétention pourra être effectuée et ainsi la séparation évaluée.

Dans un premier temps, la vitesse de rotation la plus importante possible est appliquée. On surveille que la pression maximale autorisée pour l'utilisation des raccords rotatifs reste en dessous de 70 bars. En effet, plus la vitesse de rotation est importante, meilleure est la rétention de phase stationnaire, plus les phénomènes de perte de phase stationnaire en cours d'élution sont faibles et plus l'efficacité chromatographique est importante (45-47). En revanche, la pression de travail est plus élevée (Équation 6 p.16). Ainsi, la vitesse de rotation est directement ajustée à 3000 rpm, vitesse de rotation maximale possible sur les appareillages Kromaton.

Le choix du débit de phase mobile est également une étape très importante dans la sélection des conditions opératoires. Ce dernier a une influence directe sur la durée de purification ainsi que sur le taux de phase stationnaire. Plus le débit est important, plus le taux de phase stationnaire est faible. Le temps d'élution est cependant beaucoup plus court. La durée de purification n'est pas un paramètre déterminant dans l'étape développement de méthode. En effet, même s'il est judicieux de ne pas choisir des débits trop lents pour ne pas avoir des temps d'élution trop longs, l'utilisateur a intérêt à avoir des taux de phase stationnaires raisonnables afin d'augmenter les chances de séparation des composés. C'est seulement lors de l'étape d'optimisation de la production qu'une augmentation du débit pourra être envisagée. Un paragraphe sera consacré à ces notions lors du Chapitre 3. Un débit de 3 mL/min est donc appliqué lors de ce test (Tableau 8).

Tableau 8 : Taux de phase stationnaire et pression du système en fonction de différentes vitesses de rotation à 3 mL/min. Système butanol/méthanol/eau en proportions 5/1/4 (v/v), mode descendant (phase mobile aqueuse).

Vitesse de rotation	Débit	Pression	Taux de phase stationnaire
3000 rpm	3 mL/min	13 bar	22 %
2000 rpm		18 bar	33 %
1600 rpm		33 bar	30 %

Le Tableau 8 montre qu'à 3000 rpm et 3 mL/min, le taux de phase stationnaire contenu dans la colonne est très faible (22 %). Il a été indiqué précédemment que la vitesse de rotation maximale permettait d'avoir un taux de phase stationnaire maximal. Cependant, il arrive parfois que le système solvant utilisé soit sensible à la température et à l'échauffement dû à une forte vitesse de rotation. Ainsi, deux vitesses de rotation plus faibles sont testées afin de voir si les taux de phase stationnaire sont meilleurs : 2000 et 1600 rpm pour un débit de 3 mL/min. L'observation des résultats montre qu'à ces deux champs centrifuges, les taux de phase stationnaire sont meilleurs. Cependant, ils restent très faibles puisque

jamais supérieurs à 33%. Un nouveau test pourrait être effectué à débit plus faible, mais les temps de purifications risquant de devenir beaucoup trop longs, un changement de système solvant est préférable.

4.2.3. Système heptane/méthyl *tert*-butyl éther/éthanol/eau

4.2.3.1. Construction du système solvant

Le système solvant butanol/méthanol/eau en proportions 5/1/4 (v/v) utilisé en mode descendant apparaissant adapté pour la séparation des composants du romarin mais ne présentant malheureusement pas un taux de phase stationnaire suffisant en CPC, un nouveau système solvant est construit à partir de l'éthanol en tant que « meilleur solvant » : le système heptane/méthyl *tert*-butyl éther/éthanol/eau. L'heptane et l'eau sont des solvants ne permettant pas de solubiliser beaucoup de carnosol (cf. § 4.2.1). Cependant, ces deux solvants n'étant pas miscibles entre eux, ils sont donc adaptés à la création d'un système biphasique. Le méthyl *tert*-butyl éther (MTBE) a été choisi car le carnosol est soluble dans ce solvant. Il a notamment déjà été ajouté à de l'hexane pour faciliter la dissolution du carnosol avant son injection en HPLC phase normale (48). De plus, il est miscible avec l'heptane et l'éthanol mais peu miscible avec l'eau (moins de 5% est soluble dans l'eau (49)). Quant à l'éthanol, ce dernier est complètement miscible à l'eau et l'heptane (Tableau 9).

Tableau 9 : Solubilité des solvants entre eux en % (masse). Cases en bleu = considéré comme très peu miscible ou non miscible, cases en blanc = considéré comme miscible ou partiellement miscible (49-51).

<i>Heptane</i>	<i>MTBE</i>	<i>Ethanol</i>	<i>Eau</i>	dans
	miscible	miscible	0,0091	<i>Heptane</i>
miscible		miscible	1,5	<i>MTBE</i>
miscible	miscible		miscible	<i>Ethanol</i>
0,0004	4,8	miscible		<i>Eau</i>

Le choix des proportions entre les solvants a été réalisé expérimentalement en réalisant plusieurs essais jusqu'à obtenir un système solvant biphasique. Notre première sélection se porte sur le système heptane/MTBE/éthanol/eau 3/1/2/1.

4.2.3.2. Test du système solvant par shake-flask

Les échantillons sont préparés comme indiqué au § 3.3. Chaque phase est ensuite injectée en HPLC sans dilution préalable. Les chromatogrammes HPLC des phases supérieure organique et inférieure aqueuse du système solvant heptane/MTBE/éthanol/eau 3/1/2/1 (v/v) sont visibles Figure 20. Les coefficients de partage théoriques des composés ont été calculés et directement indiqués sur les figures.

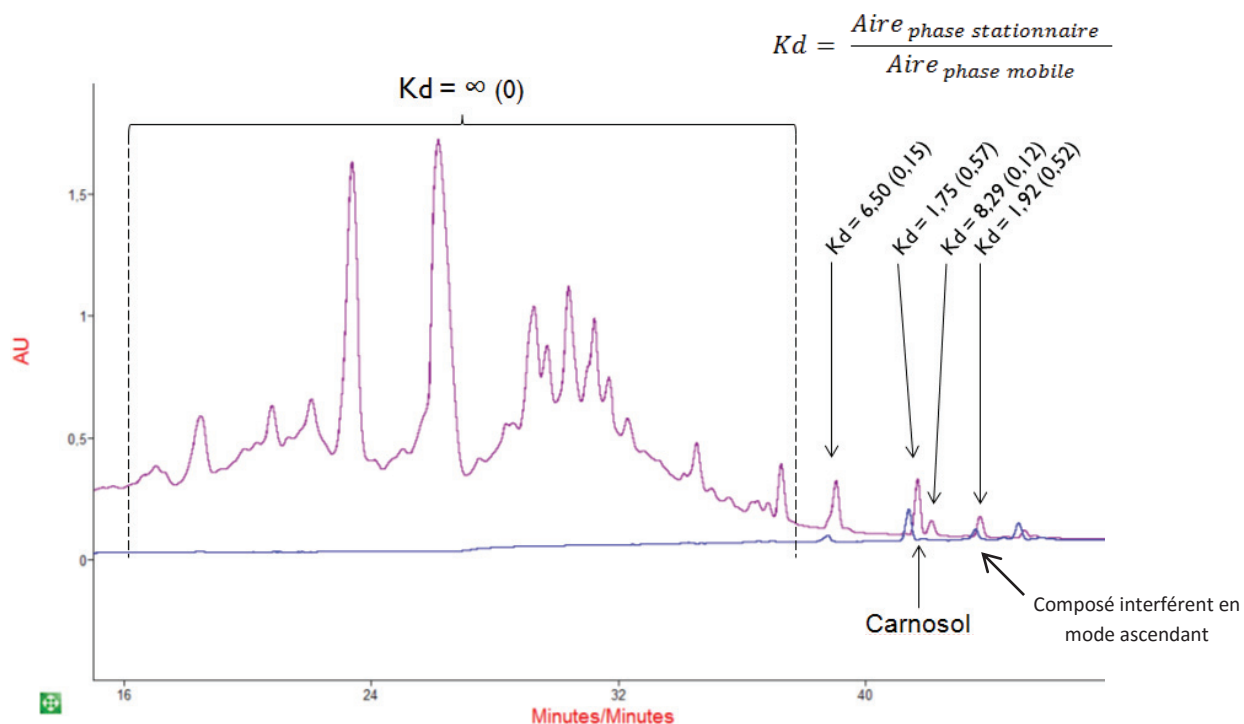


Figure 20 : Chromatogrammes HPLC après injection des phases supérieure (en bleu) et inférieure (en rose) avec calcul des coefficients de partage théoriques suivant l'utilisation du système solvant en mode ascendant (phase stationnaire = phase inférieure) ou descendant (entre parenthèses, phase stationnaire = phase supérieure).

L'observation de la Figure 20 montre que la majorité des composés sont partagés de manière plus importante dans la phase inférieure aqueuse.

Si le système solvant est utilisé en mode descendant (phase stationnaire = phase supérieure organique), les coefficients de partage des composés sont très proches les uns des autres (indiqués en parenthèses). Les résultats montrent ainsi qu'en mode descendant, une grosse partie des composés sortiraient probablement au temps mort tandis que les autres apparaîtraient très rapidement sur le chromatogramme de manière non résolue.

Si le système solvant est utilisé en mode ascendant, les coefficients de partage des composés sont beaucoup plus éloignés. Les composés les plus polaires (dont l'acide rosmarinique) seraient infiniment retenus par la colonne. Le carnosol, l'un des premiers composés à sortir ($K_{d\text{théorique}} = 1,75$) pourrait cependant potentiellement être co-élué avec un autre composé non identifié ($t_r = 43,7$ min) dont le coefficient de partage théorique est de 1,92.

Même si les résultats semblent plus encourageants dans l'utilisation de ce système solvant en mode ascendant, ce dernier sera testé dans les deux modes afin de comparer les séparations et de choisir la meilleure des deux.

4.2.3.3. Test du système solvant 3/1/2/1 en mode descendant

Le système solvant heptane/MTBE/éthanol/eau en proportions 3/1/2/1 (v/v) est testé dans un premier temps en mode descendant avant d'être comparé à une séparation en mode ascendant.

La première étape consiste à déterminer les conditions opératoires permettant d'utiliser le système solvant avec une rétention de phase stationnaire suffisante (généralement supérieure à 50%). Cette étape ne nécessite pas forcément l'injection de l'échantillon à purifier. Une fois les conditions opératoires déterminées, l'échantillon pourra alors être injecté.

Le système est testé à différentes vitesses de rotation tout en restant à une pression inférieure à 70 bar. Le débit est quant à lui régulé à 5 mL/min. Le taux de phase stationnaire est calculé pour chaque condition différente (Tableau 10) via l'injection de new coccine red, un marqueur de temps mort très polaire (52, 53), dont on a vérifié préalablement par UV qu'il ne se partage jamais dans la phase stationnaire peu polaire. Cette molécule n'est en effet soluble que dans des phases contenant de l'eau.

Tableau 10 : Variation du taux de phase stationnaire et de la pression en fonction de la vitesse de rotation appliquée au système à 5 mL/min.

Débit	Vitesse de rotation	Taux de phase stationnaire	Pression
5 mL/min	1800 rpm	56%	42 bar
	2000 rpm	58%	50 bar
	2200 rpm	58%	59 bar
	2400 rpm	58%	68 bar

L'efficacité de la colonne augmentant avec la vitesse de rotation (45-47), il est intéressant de se placer à vitesse de rotation maximale. Cependant, la pression à l'injection étant trop proche des 70 bar limite et le taux de phase stationnaire étant quasi-équivalent à toutes les vitesses de rotation, le choix est arrêté à 2200 rpm afin d'injecter à pression moins élevée (59 bar) et donc dans des conditions moins contraignantes pour les instruments.

La majorité des composés étant solubles dans la phase inférieure aqueuse (phase mobile en mode descendant), la préparation de l'échantillon de romarin à purifier sera effectuée dans cette dernière.

L'injection en CPC de l'extrait préparé à 500 mg/mL de phase inférieure à 2200 rpm et 5 mL/min résulte en la séparation illustrée Figure 21.

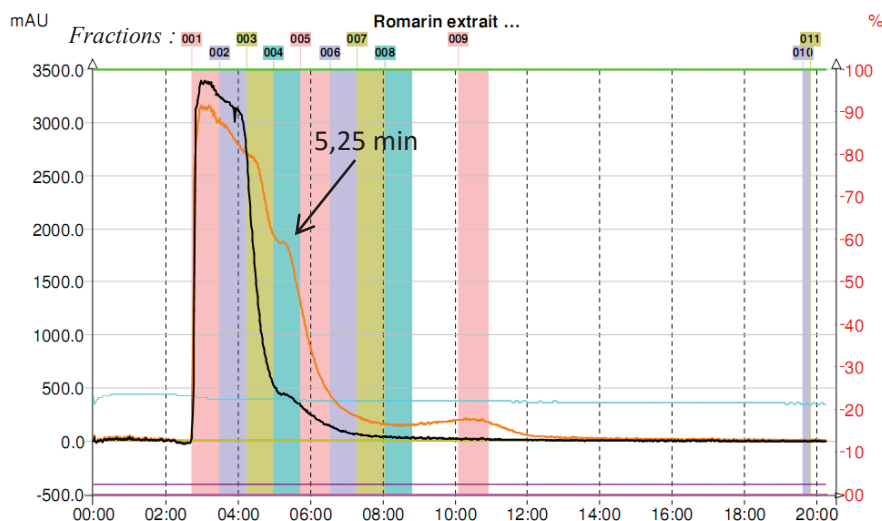


Figure 21 : Chromatogramme CPC de l'injection de 1 mL d'extrait sec de romarin préparé à 500 mg/mL en phase inférieure, 2200 rpm, 5 ml/min, système solvant heptane/MTBE/éthanol/eau 3/1/2/1 (v/v) **mode descendant** (phase mobile aqueuse), détection UV à **210** et **254** nm, Sf = 58 %, P = 59 bar. Les différentes fractions collectées sont numérotées de 001 à 011 dans la partie située au-dessus du chromatogramme.

L'observation de la Figure 21 montre que les différents composés de l'extrait de romarin sont très peu retenus et donc mal séparés. En effet, mis à part le pic à 10,5 minutes qui apparaît un peu mieux séparé, les autres solutés sont condensés dans la première partie du chromatogramme (entre 3 et 8 minutes) où on aperçoit un massif de pics co-élus. Cela rejoint tout à fait les observations faites lors des tests en shake-flask.

Connaissant le coefficient de partage théorique du carnosol (Figure 20), le volume de la colonne (35 mL) et le taux de phase stationnaire (Tableau 10), il est possible de calculer le volume de rétention théorique du carnosol et d'en déduire son temps de rétention grâce à la relation 4 du chapitre 1. Ainsi, on a $V_{R_{\text{carnosol}}} = 14,7 \times (0,57 \times 20,3) = 26,3 \text{ mL}$ soit un temps de rétention de 5,25 minutes à 5 mL/min. Il est donc possible que l'épaule à 5,25 minutes contienne le pic de carnosol (fraction 4 sur le chromatogramme). Les fractions récoltées sont analysées par HPLC afin de vérifier cette hypothèse et d'évaluer la pureté du carnosol.

L'observation des chromatogrammes HPLC des différentes fractions récoltées en CPC montre que le carnosol est présent dans les fractions 2 à 6 (Figure 22). Comme ceci a pu être prédit grâce aux coefficients de partage théoriques, la fraction 4 est celle qui contient le plus de carnosol.

La séparation CPC se révèle donc insatisfaisante puisqu'il n'a pas été possible de séparer le carnosol des impuretés présentes dans l'extrait de romarin. Ceci est principalement dû aux coefficients de partage des composés, tous du même ordre et inférieurs à 1. Afin de réaliser une comparaison entre les deux modes d'utilisation du système solvant, une nouvelle séparation est réalisée en mode ascendant (phase stationnaire inférieure).

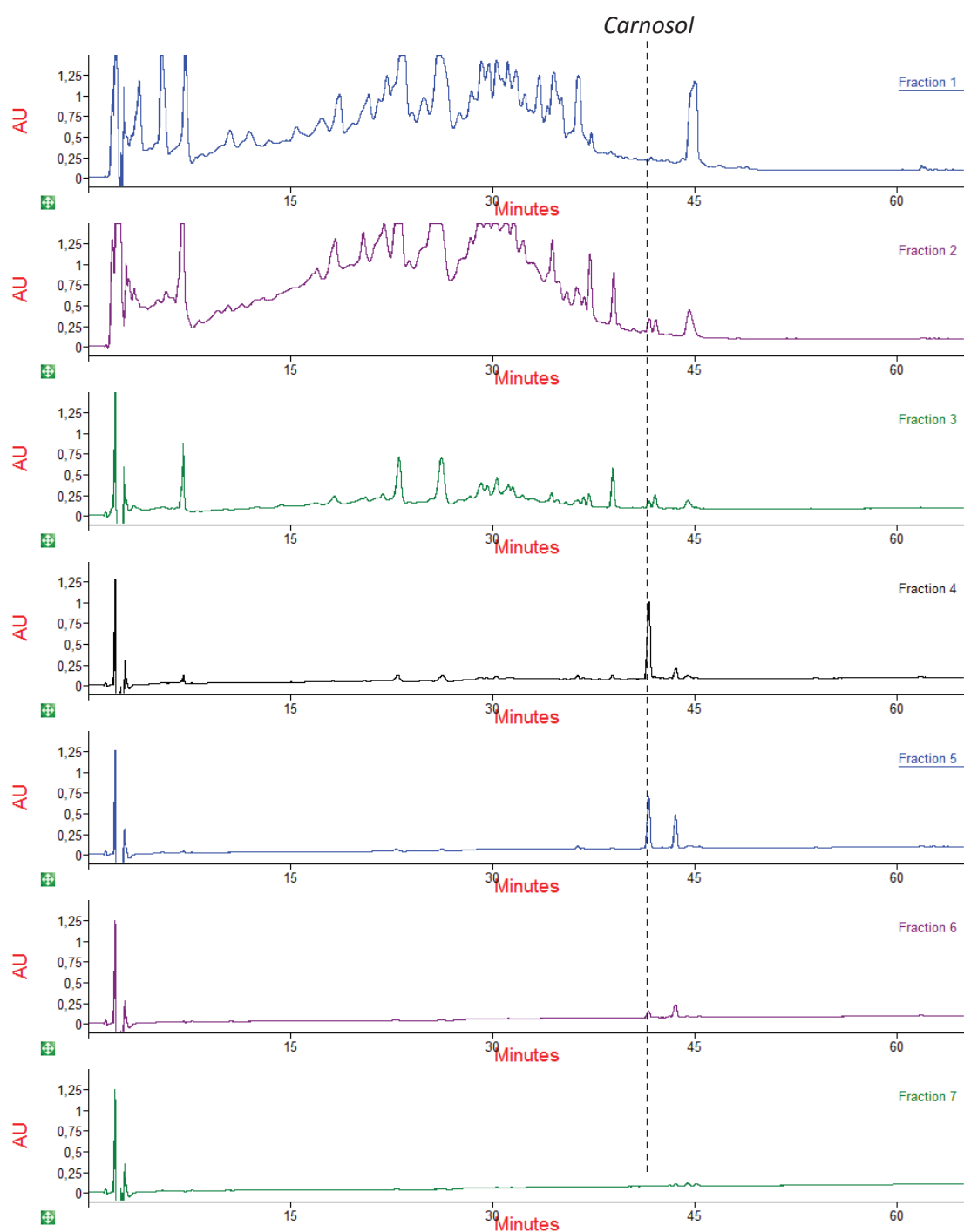


Figure 22 : Chromatogrammes HPLC des différentes fractions du romarin purifiées en CPC à l'aide du système solvant heptane/MTBE/éthanol/eau en proportions 3/1/2/1 (v/v) en mode descendant à 2200 rpm, 5 mL/min. Conditions HPLC : gradient eau – acétonitrile (Tableau 6), $V_{inj} = 20 \mu\text{L}$, détection UV 210 nm.

4.2.3.4. Test du système solvant 3/1/2/1 en mode ascendant

Le système solvant heptane/MTBE/éthanol/eau 3/1/2/1 (v/v) est à présent testé en mode ascendant. Pour plus de simplicité, le système est directement testé dans les mêmes conditions opératoires qu'en mode descendant : 2200 rpm, 5 mL/min. Comme précédemment, un marqueur de temps mort est injecté afin de calculer le taux de phase stationnaire contenu dans la colonne. La phase mobile étant cette fois-ci la phase supérieure organique, le β -carotène, molécule apolaire du fait de son grand nombre de doubles liaisons conjuguées est tout à fait approprié pour remplir ce rôle de marqueur de temps mort (52-54). Une vérification est préalablement réalisée par UV afin de s'assurer que le β -carotène ne se partage jamais dans la phase stationnaire polaire.

Après charge en phase stationnaire et équilibrage de la colonne à 2200 rpm et 5 mL/min, 1 mL de solution de β -carotène à 1 mg/mL est injectée. La mesure du temps mort permet d'en déduire un taux de phase stationnaire très satisfaisant de 63% pour une pression à l'injection de 57 bar.

Le même échantillon que dans l'expérience précédente (extrait sec à préparer à 500 mg/mL de phase inférieure) est injecté en CPC. Connaissant la valeur du taux de phase stationnaire dans la colonne dans ces conditions opératoires, les valeurs des coefficients de partage peuvent être calculées sur les pics observés en Figure 23.

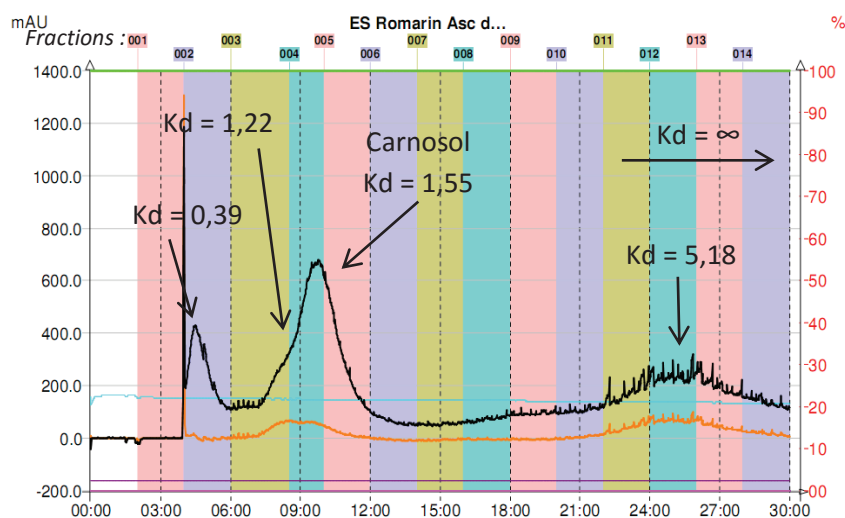


Figure 23 : Chromatogramme CPC injection 1 mL d'extrait sec préparé à 500 mg/mL, 2200 rpm, 5 ml/min, système solvant heptane/MTBE/éthanol/eau 3/1/2/1 (v/v) **mode ascendant** (phase mobile organique), détection UV à 210 et 254 nm, Sf = 63 %, P = 56 bar. Les différentes fractions collectées sont numérotées de 001 à 014 dans la partie située au-dessus du chromatogramme.

Les différentes fractions obtenues sont injectées en HPLC. L'analyse des fractions 4 et 5 (Figure 24) montre la présence de carnosol au niveau du pic dont le coefficient de partage est de 1,55. Cette valeur est proche du coefficient de partage calculé lors du shake-flask ($K_{d\text{théorique}} = 1,75$). Malgré la présence de carnosol dans les fractions 4 et 5, ce dernier n'apparaît pas pur. Cette impureté est visible sur le chromatogramme CPC (Figure 23) par l'épaulement en amont du pic de carnosol ($K_d = 1,22$).

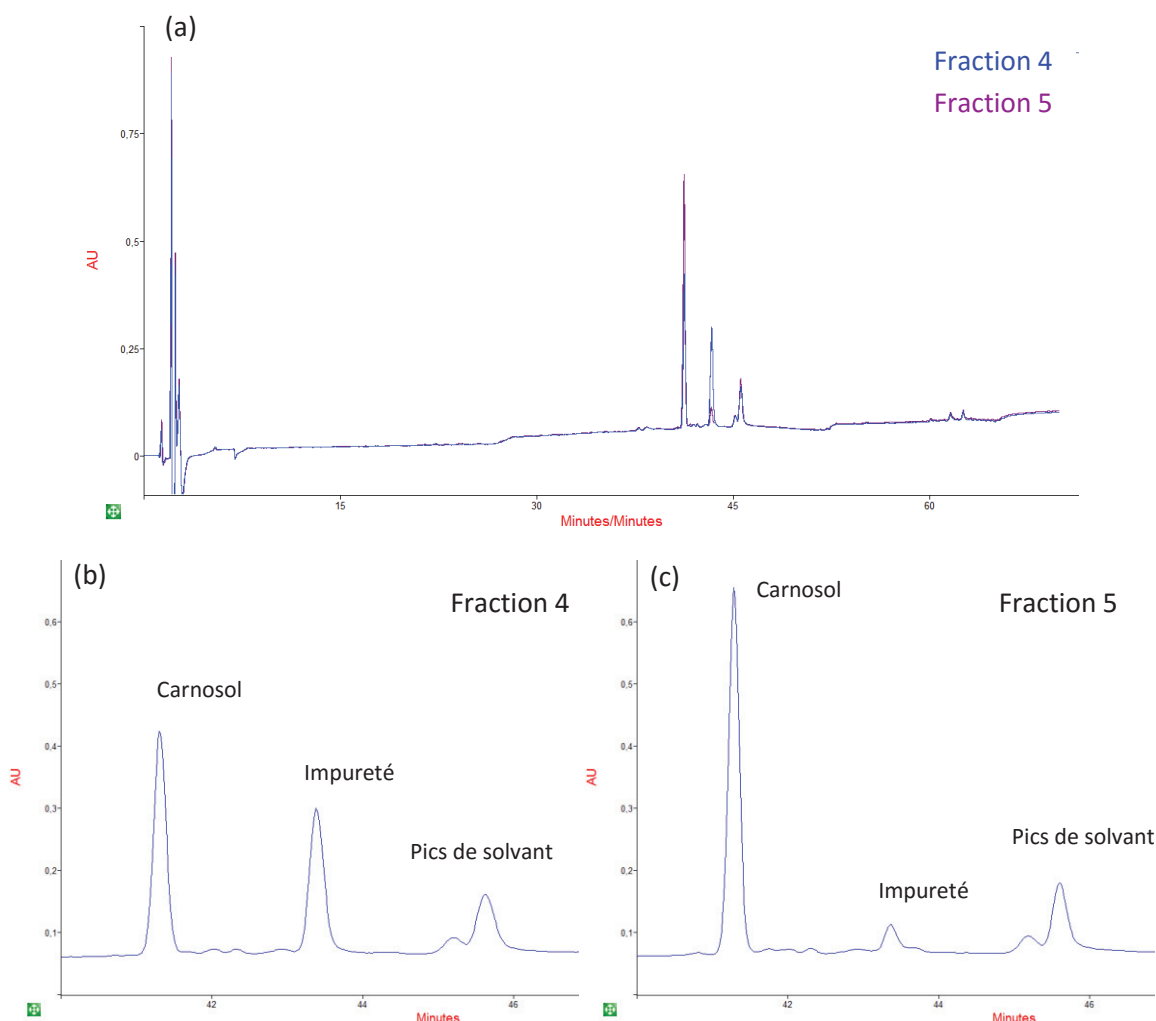


Figure 24 : Chromatogrammes HPLC des fractions 4 et 5 purifiées par CPC à l'aide du système solvant heptane/MTBE/éthanol/eau en proportions 3/1/2/1 (v/v) en mode ascendant à 2200 rpm, 5 mL/min. Gradient eau - acétonitrile, $V_{inj} = 20 \mu\text{L}$, détection UV 210 nm. (a) Superposition des fractions 4 et 5 ; (b) Zoom sur la fraction 4 ; (c) Zoom sur la fraction 5. Des pics dus aux solvants d'injection apparaissent entre 45 et 46 minutes (également présents dans le blanc).

Même si le mode ascendant présente de bien meilleurs résultats en termes de séparation du carnosol vis-à-vis des impuretés environnantes, la séparation obtenue avec le système solvant heptane/MTBE/éthanol/eau en proportions 3/1/2/1 (v/v) n'est pas encore satisfaisante. A ce stade, il serait intéressant de garder le même mode d'utilisation du système solvant et de tenter d'augmenter la rétention du carnosol sur la phase stationnaire afin d'améliorer la séparation entre ce dernier et les impuretés environnantes. Comme il a été observé précédemment (§4.2.1) le carnosol a une forte affinité pour l'éthanol, ce dernier présentant une très bonne miscibilité avec l'eau. Augmenter la proportion d'éthanol dans la phase stationnaire aqueuse devrait permettre d'accroître la rétention du carnosol.

4.2.3.5. Système solvant heptane/MTBE/éthanol/eau 3/1/3/1

Un nouveau système solvant de même nature que le précédent mais dont on augmente la proportion d'éthanol (3/1/3/1) est fabriqué. Ce dernier sera directement utilisé dans les mêmes conditions soit 2200 rpm et 5 mL/min. L'échantillon est préparé toujours de la même manière dans la phase inférieure du système solvant et 1 mL sont injectés après charge et équilibrage de la colonne. Dans ces conditions, la pression à l'injection est de 47 bar. Le taux de phase stationnaire est de 61 % (injection du β -carotène). Les coefficients de partage des composés sont indiqués directement sur le chromatogramme obtenu (Figure 25).

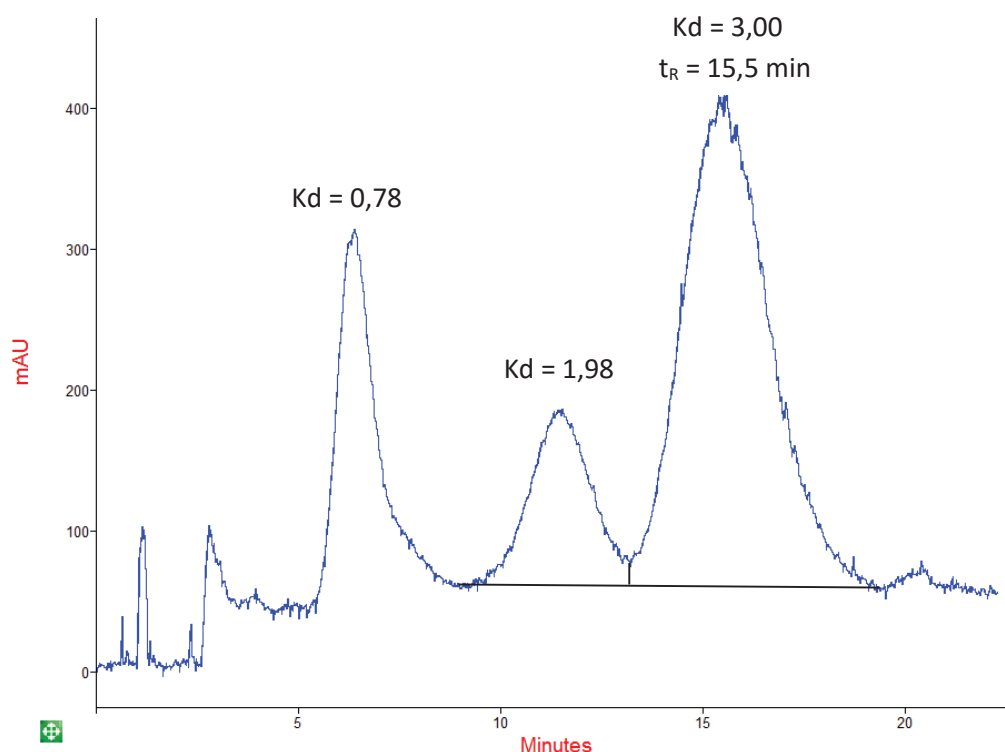


Figure 25 : Chromatogramme CPC injection 1 mL d'extrait sec préparé à 500 mg/mL, 2200 rpm, 5 ml/min, système solvant heptane/MTBE/éthanol/eau 3/1/3/1 (v/v) mode ascendant, détection UV à 210 nm, Sf = 61 %.

D'après la forme et l'intensité des pics, le pic de carnosol semble être celui dont le temps de rétention se situe entre 15 et 16 minutes.

La comparaison des chromatogrammes Figure 23 et Figure 25 permet de montrer l'évolution des coefficients de partage qui, comme attendu, deviennent plus importants dans le cas du système solvant 3/1/3/1. En effet, en ajoutant de l'éthanol dans le système, le carnosol voit son coefficient de partage évoluer de 1,55 à 3,00. La séparation n'apparaît cependant pas entièrement satisfaisante car il n'y a pas de retour total à la ligne de base entre le pic de carnosol et son impureté précédente ($K_d = 1,98$), permettant un taux de récupération et une pureté de 100% tels que définis dans le cahier des charges.

L'ajout d'éthanol dans le système solvant ayant permis d'augmenter la rétention du carnosol, la stratégie est poursuivie en faisant évoluer le système solvant dans des proportions 4/1/4/1. Ici, la quantité d'heptane est augmentée au même titre que celle d'éthanol pour essayer de garder des proportions équivalentes de phases supérieures et inférieures.

4.2.3.6. Système solvant heptane/MTBE/éthanol/ eau 4/1/4/1

Afin d'augmenter le coefficient de partage des composés, le système solvant 3/1/3/1 est modifié vers un système solvant 4/1/4/1 (v/v). Les conditions opératoires 2200 rpm et 5 mL/min sont à nouveau testées pour ce nouveau système. L'échantillon est préparé en phase stationnaire inférieure (500 mg d'extrait sec par mL de solvant) puis 1 mL est injecté après charge et équilibrage de la colonne. La pression à l'injection est de 47 bar. Le taux de phase stationnaire est de 62% (injection du β -carotène). Les différents coefficients de partage des composés sont calculés et notés directement sur le chromatogramme CPC (Figure 26).

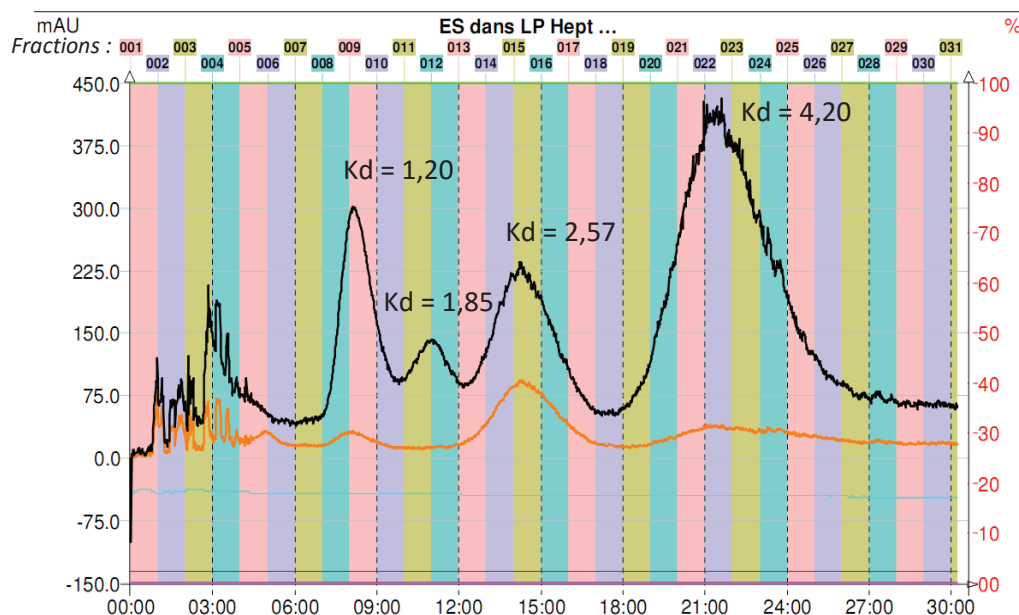


Figure 26 : Chromatogramme CPC injection 1 mL d'extrait sec préparé à 500 mg/mL, 2200 rpm, 5 ml/min, système solvant heptane/MTBE/éthanol/eau 4/1/4/1 (v/v) mode ascendant, détection UV à 210 et 284 nm, Sf = 62 %, P = 47 bar. Les différentes fractions collectées sont représentées de 4 couleurs différentes et numérotées de 001 à 031 dans la partie située au-dessus du chromatogramme.

La forme et l'intensité relative des pics permettent de reconnaître le pic du carnosol à un temps de rétention de 21 minutes. Afin de garantir que ce dernier est bien celui du carnosol et de s'assurer de sa pureté, toutes les fractions sont injectées en HPLC. La Figure 27 permet d'observer les résultats de l'injection des fractions 19 à 26.

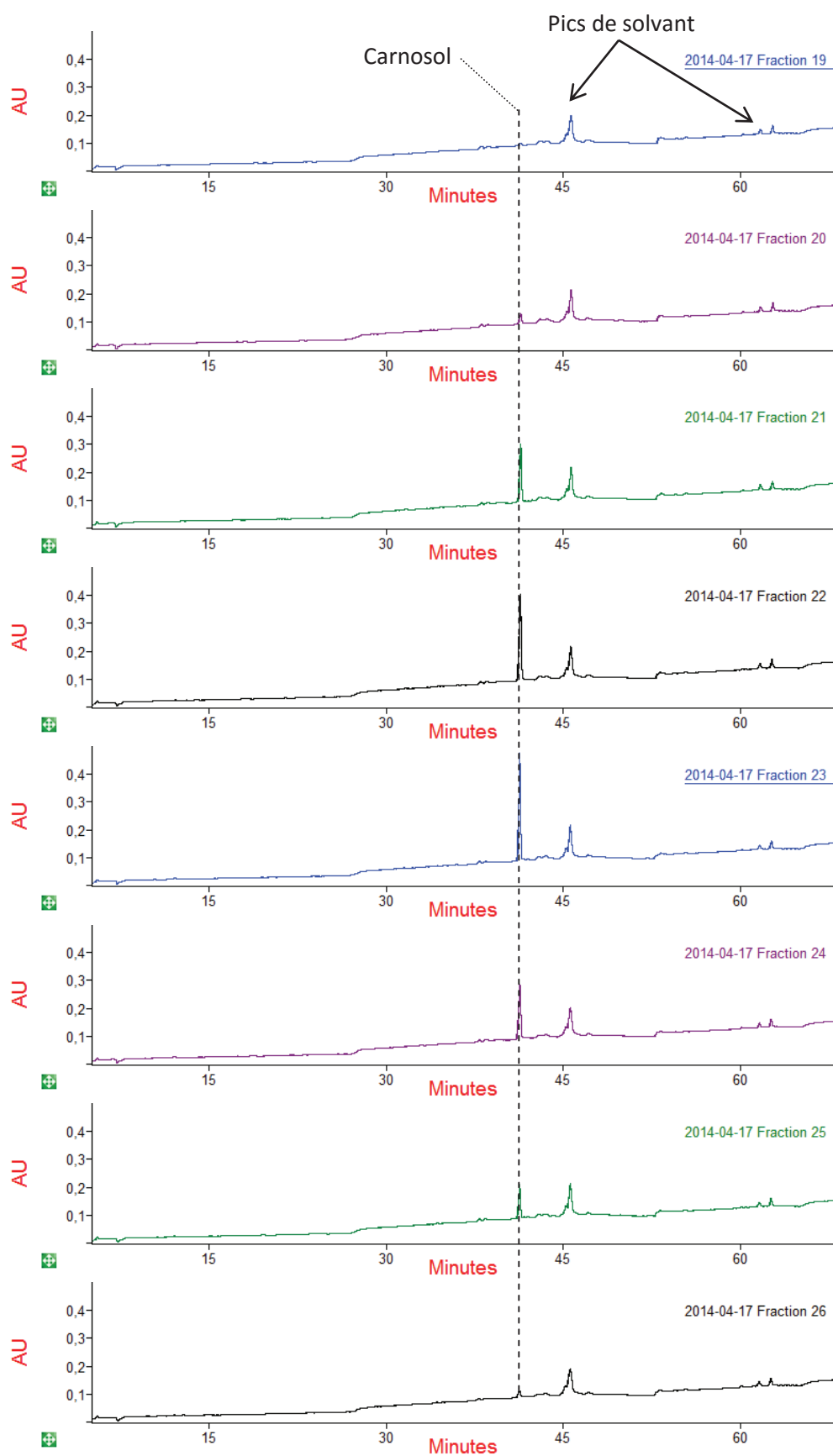


Figure 27 : Chromatogrammes HPLC des fractions 19 à 26 purifiées par CPC à l'aide du système solvant heptane/MTBE/éthanol/eau en proportions 4/1/4/1 (v/v) en mode ascendant à 2200 rpm, 5 mL/min. Gradient eau - acétonitrile, $V_{inj} = 20 \mu\text{L}$, détection UV 210 nm.

L'observation de la Figure 27 permet de confirmer que le pic à 21 minutes est bien celui du carnosol, dont le coefficient de partage est calculé à 4,20. Les fractions 19 à 26 apparaissent toutes pures puisque les autres pics observés sur les chromatogrammes sont uniquement ceux du solvant de récupération en sortie de CPC (déterminé par comparaison avec un blanc).

La séparation réalisée en CPC à l'aide du système solvant heptane/MTBE/éthanol/eau en proportions 4/1/4/1 (v/v) utilisé en mode ascendant apparaît donc comme satisfaisante puisqu'un retour à la ligne de base est observé entre le pic de carnosol et son impureté la plus proche (impureté précédente) en accord avec le cahier des charges que nous nous sommes fixé, et l'analyse HPLC des différentes fractions contenant du carnosol apparaissent pures en UV. Afin de s'assurer d'une pureté totale de l'échantillon, une analyse en spectrométrie de masse ou en RMN pourrait être effectuée. En effet, le fait qu'aucun pic d'impureté n'apparaisse sur les chromatogrammes des fractions collectées (détection UV) ne nous permet malheureusement pas d'assurer la pureté à 100% de notre composé, mais il permet cependant d'affirmer que tous les autres composés détectés lors de la séparation initiale ont été écartés.

L'étape suivant la purification d'un composé consiste à évaporer les solvants dans lesquels sont récupérés les composés. Dans le cas de la purification du carnosol à l'aide du système solvant heptane/MTBE/éthanol/eau en proportions 4/1/4/1 (v/v) utilisé en mode ascendant, le carnosol est récupéré dans la phase mobile, soit la phase supérieure. Cette phase supérieure étant composée principalement d'heptane, de MTBE et d'éthanol, une évaporation à l'aide d'un évaporateur rotatif est tout à fait envisageable, accompagné d'une lyophilisation si une petite quantité d'eau reste en fin d'évaporation.

4.3. Quantification

4.3.1. Quantité de matière contenue dans l'extrait à purifier par CPC

L'objectif de cette section est de calculer la quantité de matière contenue dans 1 mL d'extrait à purifier après solubilisation de l'extrait sec commercial dans la phase inférieure du système solvant. Ceci permettra de connaître la quantité d'extrait à purifier injectée en CPC lors d'une opération. Le protocole de préparation de l'extrait sec commercial puis de l'extrait à purifier par CPC est rappelé Figure 28.

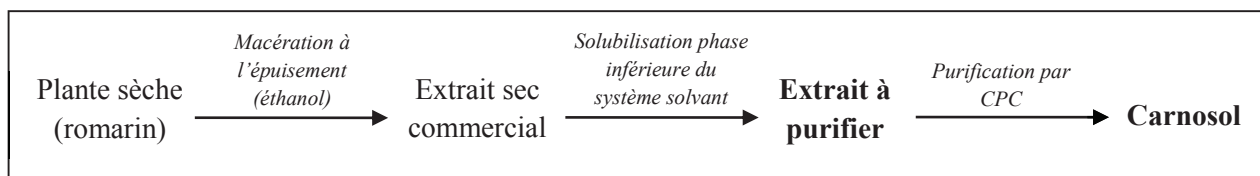


Figure 28 : Protocole d'extraction, de la plante à l'extrait à purifier par CPC

Afin de connaître le rendement de solubilisation de l'extrait sec commercial par la phase inférieure du système solvant CPC (heptane/MTBE/éthanol/eau 4/1/4/1 (v/v)), 1 mL de l'extrait à purifier est ramené à sec pendant une semaine sous hotte puis une nuit sous un dessiccateur sous vide afin d'évaporer toute trace de solvants. La matière sèche récupérée est pesée. Elle correspond directement à la quantité de matière solubilisée par le système solvant. L'expérience est répétée 5 fois.

La quantité de matière contenue dans 1 mL d'extrait à purifier est calculée à **181 mg**. Pour rappel, la solubilisation de l'extrait sec commercial est réalisée à 500 mg par mL de phase inférieure du système solvant CPC (§ 3.4.3). Le rendement d'extraction de l'extrait sec commercial par la phase inférieure du système solvant CPC est donc de 36 %.

4.3.2. Quantification du carnosol

Dans le but de quantifier le carnosol contenu dans l'extrait à purifier mais aussi après purification par CPC, un étalonnage externe est réalisé par injection HPLC du standard de carnosol.

Une première injection HPLC est réalisée afin de comparer l'aire du pic de carnosol dans l'extrait à purifier et l'aire du pic obtenu lors de l'injection d'un standard de carnosol à 63 µg/mL dilué dans du méthanol. La valeur de la concentration en carnosol approximative contenue dans l'extrait de romarin à purifier est estimée à 86 µg/mL. Les effets matrices sont ici négligés car ce calcul ne sert qu'à estimer une concentration dans le but de réaliser la courbe d'étalonnage. Au vu de cette valeur estimée, la courbe d'étalonnage est réalisée entre 0 et 100 µg/mL avec un point tous les 25 µg/mL.

Comme pour la préparation de l'échantillon de romarin à purifier, la courbe de calibration est réalisée dans la phase inférieure du système solvant heptane/MTBE/éthanol/eau 4/1/4/1 (v/v).

Chaque solution de standard est injectée 3 fois en HPLC. Les aires de chaque pic de carnosol obtenues via le logiciel Azur (Datalys) permettent d'établir la droite d'étalonnage (Figure 29).

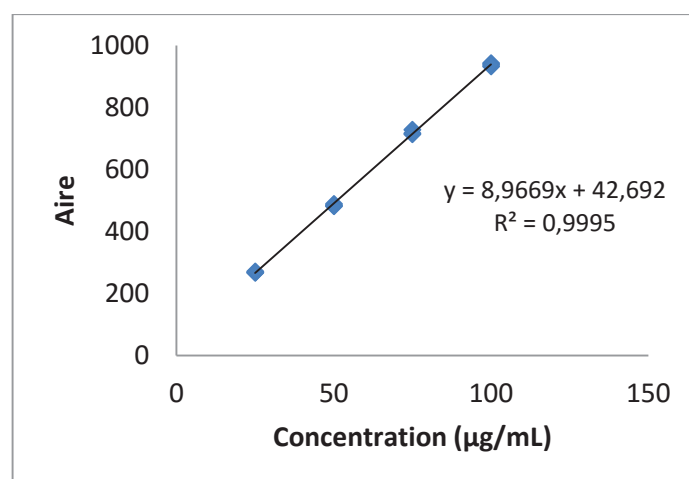


Figure 29 : Droite d'étalonnage externe pour la quantification du carnosol contenu en phase inférieure du système solvant heptane/MTBE/éthanol/eau en proportions 4/1/4/1 (v/v).

D'après la courbe de calibration, la concentration en carnosol contenue dans l'échantillon avant injection est évaluée à 873 µg/mL. En réalisant la quantification du carnosol dans chaque fraction récoltée sur une opération, le taux de récupération a été estimé proche de 90 %. Ainsi, pour une injection de 1 mL de carnosol à 873 µg/mL, il est possible de récupérer environ 0,8 g de carnosol avec une pureté proche de 100 %.

La durée d'une opération est de 39 min (0,65 h) en prenant en compte la durée d'équilibrage de la colonne ainsi que l'élution et l'extrusion. Ainsi, le rendement horaire est de 1,2 g de carnosol/h. La consommation de solvant a quant à elle été évaluée à 0,13 L donnant une productivité de 6,2 g carnosol/L de solvant. En chromatographie préparative, il n'est pas rare de parler de productivité en masse par litre de colonne. Dans le cas de la purification du carnosol, le volume de la colonne est de 35 mL. Ainsi la productivité est de 22,9 g/L de colonne.

5. Conclusion et perspectives

Dans ce chapitre, nous avons pu montrer qu'il était possible de réaliser la purification du carnosol provenant d'un extrait éthanolique de romarin par CPC à l'aide d'un système solvant composé d'heptane/MTBE/éthanol/eau en proportions 4/1/4/1 (v/v), utilisé en mode ascendant.

Le développement de la méthode de purification a été réalisé sur un appareil de laboratoire dont le volume de la colonne est de 35 mL, dans le but de raccourcir les temps de manipulation et de consommer moins de solvant. Le choix du système solvant a été effectué en se basant sur la méthode du « meilleur solvant », pour laquelle un premier solvant est choisi en fonction de ses capacités à bien dissoudre le soluté d'intérêt, auquel sont ajoutés des solvants plus et moins polaires afin de créer un système biphasique. Deux systèmes solvant ont été développés ici. Le choix de ces deux systèmes a été effectué par mesure des coefficients de partage théorique des composés d'intérêt par HPLC (shake-flask). Ce sont les tests en CPC qui ont ensuite permis de définir le système solvant adéquat en vérifiant la bonne séparation du carnosol des impuretés environnantes.

Grâce à cette méthode de purification, 0,8 g de carnosol ont pu être purifiés avec un taux de récupération proche de 90% et une pureté proche de 100%. Le rendement horaire est calculé à 1,2 g/h. La consommation de solvants est estimée à 1L pour 6,2 g de carnosol purifiés. Si la méthode avait été développée sur un rotor de plus grand volume tel que 254 mL, nous pouvons estimer que la consommation de solvants aurait été beaucoup plus importante. En effet, le même nombre de manipulations aurait été requis tandis que la colonne utilisée et le débit aurait été plus grands, engendrant ainsi cette consommation de solvants beaucoup plus importante.

Références

1. S. F. Brennan, M. M. Cantwell, C. R. Cardwell, L. S. Velentzis, J. V. Woodside, Dietary patterns and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *The American journal of clinical nutrition* **91**, 1294-1302 (2010).
2. V. Cottet, M. Touvier, A. Fournier, M. S. Touillaud, L. Lafay, F. Clavel-Chapelon, M.-C. Boutron-Ruault, Postmenopausal breast cancer risk and dietary patterns in the E3N-EPIC prospective cohort study. *American journal of epidemiology*, **170** 1257-1267 (2009).
3. L. B. Dixon *et al.*, Adherence to the USDA Food Guide, DASH Eating Plan, and Mediterranean dietary pattern reduces risk of colorectal adenoma. *The Journal of nutrition* **137**, 2443-2450 (2007).
4. U. Facchini, M. Camnasio, A. Cantaboni, A. Decarli, C. La Vecchia, Geographical variation of cancer mortality in Italy. *International Journal of epidemiology* **14**, 538-548 (1985).
5. C. Fortes, F. Forastiere, S. Farchi, S. Mallone, T. Trequattrinni, F. Anatra, G. Schmid, C. A. Perucci, The protective effect of the Mediterranean diet on lung cancer. *Nutrition and cancer* **46**, 30-37 (2003).
6. S. Piscopo, The Mediterranean diet as a nutrition education, health promotion and disease prevention tool. *Public health nutrition* **12**, 1648-1655 (2009).
7. S. Cheung, J. Tai, Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary *Rosmarinus officinalis*. *Oncology reports* **17**, 1525-1531 (2007).
8. O. Yesil-Celiktas, C. Sevimli, E. Bedir, F. Vardar-Sukan, Inhibitory effects of rosemary extracts, carnosic acid and rosmarinic acid on the growth of various human cancer cell lines. *Plant Foods for Human Nutrition* **65**, 158-163 (2010).
9. L. Almela, B. Sánchez-Muñoz, J. A. Fernández-López, M. J. Roca, V. Rabe, Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *Journal of Chromatography A* **1120**, 221-229 (2006).
10. J. J. Johnson, Carnosol: A promising anti-cancer and anti-inflammatory agent. *Cancer Letters* **305**, 1-7 (2011).
11. J. Tai, S. Cheung, M. Wu, D. Hasman, Antiproliferation effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on human ovarian cancer cells in vitro. *Phytomedicine* **19**, 436-443 (2012).
12. M. J. Jordán, V. Lax, M. C. Rota, S. Lorán, J. A. Sotomayor, Relevance of carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid concentrations in the in vitro antioxidant and antimicrobial activities of *Rosmarinus officinalis* (L.) methanolic extracts. *Journal of agricultural and food chemistry* **60**, 9603-9608 (2012).
13. D. R. Berdahl, J. McKeague, in *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*, F. Shahidi, Ed. (Elsevier Science, 2015), chap. 8, pp. 177-217.
14. L. Trojáková, Z. Réblová, H. T. T. Nguyen, J. A. N. Pokornya, Antioxidant activity of rosemary and sage extracts in rapeseed oil. *Journal of Food Lipids* **8**, 1-13 (2001).
15. J. C. Luis, C. B. Johnson, Seasonal variations of rosmarinic and carnosic acids in rosemary extracts. Analysis of their in vitro antiradical activity. *Spanish Journal of Agricultural Research* **3**, 106-112 (2005).
16. E. N. Frankel, S.-W. Huang, R. Aeschbach, E. Prior, Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**, 131-135 (1996).
17. Y. Zhang, J. P. Smuts, E. Dodbiba, R. Rangarajan, J. C. Lang, D. W. Armstrong, Degradation study of carnosic acid, carnosol, rosmarinic acid, and rosemary extract (*Rosmarinus officinalis* L.) assessed using HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**, 9305-9314 (2012).

18. N. Mulinacci, M. Innocenti, M. Bellumori, C. Giaccherini, V. Martini, M. Michelozzi, Storage method, drying processes and extraction procedures strongly affect the phenolic fraction of rosemary leaves: an HPLC/DAD/MS study. *Talanta* **85**, 167-176 (2011).
19. K. Schwarz, W. Ternes, E. Schmauderer, Antioxidative Constituents Of *Rosmarinus officinalis* And *Salvia officinalis*. III. Stability Of Phenolic Diterpenes Of Rosemary Extracts Under Thermal Stress As Required For Technological Processes. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung* **195**, 104-107 (1992).
20. X. Liu, J. Du, Y. Ou, H. Xu, X. Chen, A. Zhou, L. He, Y. Cao, Degradation pathway of carnosic acid in methanol solution through isolation and structural identification of its degradation products. *European Food Research and Technology* **237**, 617-626 (2013).
21. K. Schwarz, W. Ternes, Antioxidative Constituents Of *Rosmarinus officinalis* And *Salvia officinalis*. II. Isolation Of Carnosic Acid And Formation Of Other Phenolic Diterpenes. *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und Forschung* **195**, 99-103 (1992).
22. A. B. Hjorth, C. Christophersen, B. M. Hausen, T. Menné, Occupational allergic contact dermatitis from carnosol, a naturally-occurring compound present in rosemary. *Contact Dermatitis* **37**, 99-100 (1997).
23. N. Okamura, Y. Fujimoto, S. Kuwabara, A. Yagi, High-performance liquid chromatographic determination of carnosic acid and carnosol in *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. *Journal of Chromatography A* **679**, 381-386 (1994).
24. N. Fischer, B. Weinreich, S. Nitz, F. Drawert, Applications of high-speed counter-current chromatography for the separation and isolation of natural products. *Journal of Chromatography A* **538**, 193-202 (1991).
25. Y. Ito, Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **1065**, 145-168 (2005).
26. A. P. Foucault, in *Centrifugal partition chromatography*, A. P. Foucault, Ed. (M. Dekker, 1995), chap. 4, pp. 71-97.
27. J.-H. Renault, J.-M. Nuzillard, O. Intes, A. Maciuk, in *Countercurrent chromatography: the support-free liquid stationary phase*, A. Berthod, Ed. (Elsevier, 2002), chap. 3, pp. 49-83.
28. F. Oka, H. Oka, Y. Ito, Systematic search for suitable two-phase solvent systems for high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **538**, 99-108 (1991).
29. A. P. Foucault, L. Chevolot, Counter-current chromatography: instrumentation, solvent selection and some recent applications to natural product purification. *Journal of Chromatography A* **808**, 3-22 (1998).
30. E. Hopmann, W. Arlt, M. Minceva, Solvent system selection in counter-current chromatography using conductor-like screening model for real solvents. *Journal of Chromatography A* **1218**, 242-250 (2011).
31. S. Marsden-Jones, N. Colclough, I. Garrard, N. Sumner, S. Ignatova, Using quantitative structure activity relationship models to predict an appropriate solvent system from a common solvent system family for countercurrent chromatography separation. *Journal of Chromatography A* **1398**, 66-72 (2015).
32. K. D. Yoon, Y.-W. Chin, J. Kim, Centrifugal partition chromatography: application to natural products in 1994–2009. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **33**, 1208-1254 (2010).
33. E. Hopmann, A. Frey, M. Minceva, A priori selection of the mobile and stationary phase in centrifugal partition chromatography and counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **1238**, 68-76 (2012).
34. G. F. Pauli, S. M. Pro, J. B. Friesen, Countercurrent Separation of Natural Products. *Journal of Natural Products* **71**, 1489-1508 (2008).
35. N. Troncoso, H. Sierra, L. Carvajal, P. Delpiano, G. Günther, Fast high performance liquid chromatography and ultraviolet–visible quantification of principal phenolic antioxidants in fresh rosemary. *Journal of Chromatography A* **1100**, 20-25 (2005).

36. M. Abert Vian, F. Chemat, L. Prat, C. Gourdon, in *Éco-extraction du végétal: procédés innovants et solvants alternatifs*, F. Chemat, Ed. (Dunod, 2011), chap. 1, pp. 1-26.
37. T. Liu, X. Sui, R. Zhang, L. Yang, Y. Zu, L. Zhang, Y. Zhang, Z. Zhang, Application of ionic liquids based microwave-assisted simultaneous extraction of carnosic acid, rosmarinic acid and essential oil from *Rosmarinus officinalis*. *Journal of Chromatography A* **1218**, 8480-8489 (2011).
38. M. Herrero, M. Plaza, A. Cifuentes, E. Ibáñez, Green processes for the extraction of bioactives from Rosemary: Chemical and functional characterization via ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and in-vitro assays. *Journal of Chromatography A* **1217**, 2512-2520 (2010).
39. S. Başkan, N. Öztekin, F. B. Erim, Determination of carnosic acid and rosmarinic acid in sage by capillary electrophoresis. *Food Chemistry* **101**, 1748-1752 (2007).
40. A. Maciuk, A. Toribio, M. Zeches-Hanrot, J.-M. Nuzillard, J.-H. Renault, M. I. Georgiev, M. P. Ilieva, Purification of rosmarinic acid by strong ion-exchange centrifugal partition chromatography. *Journal of liquid chromatography & related technologies* **28**, 1947-1957 (2005).
41. R. Sáenz-López, P. Fernández-Zurbano, M. a. T. Tena, Capillary electrophoretic separation of phenolic diterpenes from rosemary. *Journal of Chromatography A* **953**, 251-256 (2002).
42. I. Koudous, W. Kunz, J. Strube, in *Green Extraction of Natural Products: Theory and Practice*, F. Chemat, J. Strube, Eds. (John Wiley & Sons, 2015), chap. 6, pp. 173-236.
43. A. Berthod, M. Hassoun, M. J. Ruiz-Angel, Alkane effect in the Arizona liquid systems used in countercurrent chromatography. *Analytical and bioanalytical chemistry* **383**, 327-340 (2005).
44. O. J. Catchpole, N. E. Durling, J. B. Grey, W. Eltringham, S. J. Talon, in *Current trends of supercritical fluid technology in pharmaceutical, nutraceutical and food processing industries*, A. R. C. Duarte, C. M. M. Duarte, Eds. (Bentham Science Publishers, 2009), chap. 8, pp. 71-79.
45. L. Marchal, A. Foucault, G. Patissier, J. M. Rosant, J. Legrand, Influence of flow patterns on chromatographic efficiency in centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography A* **869**, 339-352 (2000).
46. L. Marchal, J. Legrand, A. Foucault, Mass transport and flow regimes in centrifugal partition chromatography. *AIChE journal* **48**, 1692-1704 (2002).
47. D. W. Armstrong, G. L. Bertrand, A. Berthod, Study of the origin and mechanism of band broadening and pressure drop in centrifugal countercurrent chromatography. *Analytical chemistry* **60**, 2513-2519 (1988).
48. Q. Zhang, E. J. C. van der Klift, H.-G. Janssen, T. A. van Beek, An on-line normal-phase high performance liquid chromatography method for the rapid detection of radical scavengers in non-polar food matrixes. *Journal of Chromatography A* **1216**, 7268-7274 (2009).
49. J. T. Przybytek, in *High Purity Solvent Guide: Specifications, Applications, Physical Properties, Safety Data*, P. A. Krieger, Ed. (Burdick & Jackson Laboratories, 1984), pp. 80-81.
50. A. Skrzecz, D. G. Shaw, A. Maczynski, IUPAC-NIST Solubility Data Series 69. Ternary Alcohol-Hydrocarbon-Water Systems. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **28**, 983-1235 (1999).
51. K. Faure, E. Bouju, P. Suchet, A. Berthod, Limonene in Arizona liquid systems used in countercurrent chromatography. I Physicochemical properties. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **406**, 5909-5917 (2014).
52. J. B. Friesen, G. F. Pauli, Rational development of solvent system families in counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **1151**, 51-59 (2007).
53. H. Guzlek, P. L. Wood, L. Janaway, Performance comparison using the GUESS mixture to evaluate counter-current chromatography instruments. *Journal of Chromatography A* **1216**, 4181-4186 (2009).
54. J. Brent Friesen, G. F. Pauli, GUESS—A generally useful estimate of solvent systems for CCC. *Journal of liquid chromatography & related technologies* **28**, 2777-2806 (2005).

Chapitre 3

Méthodologie de transfert d'échelle

1. État de l'art

La chromatographie de partage centrifuge (CPC) est une technique de purification destinée à être utilisée à échelle préparative en milieu industriel (pharmaceutique, cosmétique, agroalimentaire, etc.). Cette purification doit donc pouvoir être effectuée sur de grandes quantités de solutés et avec des méthodes optimisées afin de pouvoir travailler avec la meilleure productivité possible. Cependant, il est très difficile d'optimiser une méthode directement sur un appareil de gros volume. En effet, comparativement à une petite machine, un développement de méthode sur une grosse machine est très consommateur de temps, de solvant, et présente ainsi un coût élevé. Il est donc beaucoup plus économique de réaliser un développement de méthode sur un appareil de petit volume. C'est sur cette idée que Rousselet-Robatel-Kromaton a imaginé puis fabriqué un rotor de laboratoire de 35 mL afin de pouvoir développer et optimiser des méthodes de purification puis les transférer sur d'autres appareils de volume plus important.

Contrairement aux systèmes hydrodynamiques, la difficulté qui réside aujourd'hui en CPC est l'absence de règles qui permettent le transfert d'une méthode entre deux appareils, également appelé scale-up.

Sur un système hydrodynamique, la règle reste relativement simple car il est souvent possible de réaliser un scale-up linéaire. Ainsi, plusieurs équipes scientifiques ont montré qu'une méthode pouvait être transférée à plus grande échelle simplement en adaptent le débit au rapport des volumes des deux colonnes (1-9). Ce rapport, aussi appelé facteur de scale-up permet de réaliser une séparation en un temps identique mais en injectant autant de fois plus que la valeur de ce facteur. Cette loi linéaire impose cependant de nombreuses contraintes opératoires qui peuvent parfois être difficilement atteignable selon l'appareillage utilisé : travailler à taux de phase stationnaire constant, à champ centrifuge constant, et à débit proportionnel au facteur de scale-up afin de garder les mêmes temps de séparation (1).

Wood et al. (1) ont par exemple réalisé un transfert sur la séparation d'alcool benzylique et de paracrésol entre deux systèmes hydrodynamiques Dynamic Extraction (DE). L'objectif est de réaliser une séparation identique entre une bobine analytique de 5,4 mL et une autre bobine 850 fois plus grande (4,6 L), en un temps identique et à taux de phase stationnaire constant. Le débit est donc augmenté de 850 au même titre que la quantité d'échantillon injectée (Tableau 11). Mis à part le taux de phase stationnaire qui diminue entre les deux séparations (64% sur colonne analytique, 47% sur colonne préparative), probablement dû à l'impossibilité de travailler à rotations plus élevées à grande échelle, la séparation entre les deux échelles apparaît identique (Figure 30).

Tableau 11 : Scale-up réalisé entre deux appareils hydrostatiques de 5,4 et 4600 mL (1).

	Analytique (mini-DE)		Préparative (maxi-DE)
Vcolonne	5,4 mL	X 850	4600 mL
Débit	1 mL/min	X 850	850 mL/min
Rotations	2100 rpm		600 rpm
Taux de phase stationnaire	64 %	>	47 %
Véchantillon	1,07 mL	X 850	920 mL
Masse injectée	0,066 g	X 850	57 g
Résolution	0,69	≈	0,71

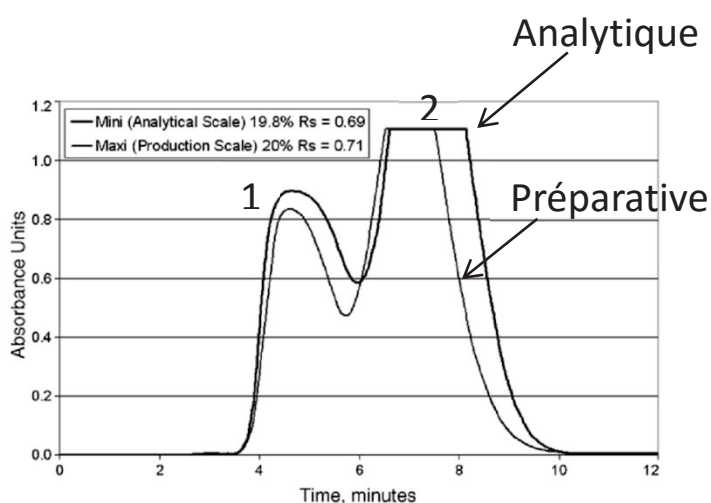


Figure 30 : Comparaison injections analytique (mini-DE) et préparative (maxi-DE). Séparation alcool benzylique (1) et para-crésol (2), $V_{inj} = 20\%$ du volume colonne (1).

Dans cet exemple, les auteurs s'attachent à réaliser un changement d'échelle à taux de phase stationnaire constant. Or, les contraintes d'appareillage ne leur permettent pas de garder la même proportion de phase stationnaire entre les deux colonnes. Malgré cela, la séparation reste similaire entre les deux échelles. On peut alors se demander ce qu'il se passerait si le taux de phase stationnaire à grande échelle était identique voire supérieur à celui obtenu à petite échelle. La séparation serait probablement meilleure, ce qui engendrerait un espace supplémentaire permettant en réalité de charger plus la colonne et ainsi augmenter la quantité d'échantillon traitée. Dans ces conditions, serait-il possible de calculer la quantité d'échantillon supplémentaire à injecter ?

Dans un autre exemple, Luo et al. (2) réalisent la séparation de quatre alcaloïdes phénoliques sur deux systèmes hydrodynamiques Dynamic Extraction de 18 mL (mini-DE) et 912 mL (midi-DE). Ici encore, l'objectif est de réaliser un changement d'échelle linéaire à taux de phase stationnaire constant. Le rapport des volumes colonne est de 50. Le débit est donc augmenté de 50, tout comme la quantité d'échantillon injectée (Tableau 12). Ici, l'utilisateur n'étant pas limité par des contraintes mécaniques venant de l'appareillage, la force centrifuge a pu être gardée constante.

Tableau 12 : Scale-up réalisé entre deux appareils hydrodynamiques de 18 mL et 912 mL (2).

	Analytique (mini-DE)		Préparative (midi-DE)
Vcolonne	18 mL	X 50	912 mL
Débit	1 mL/min	X 50	50 mL/min
Rotations	1850 rpm (191 g)	=	1250 rpm (192 g)
Taux de phase stationnaire	56,3 %	=	56,8 %
Véchantillon	0,5 mL	X 50	25 mL
Masse injectée	10 mg	X 50	500 mg

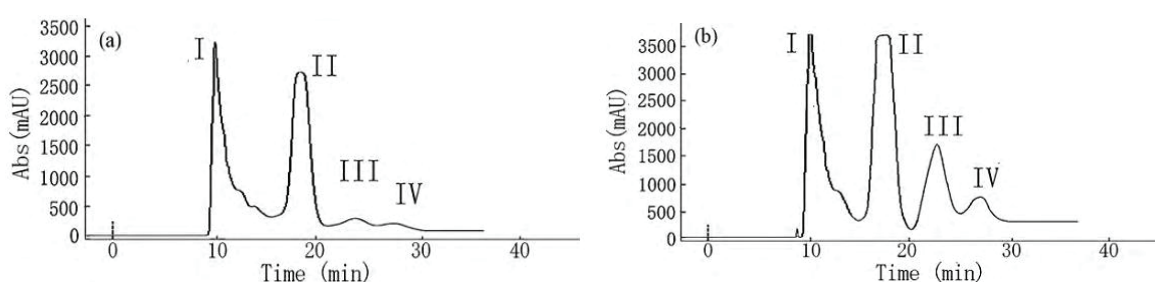


Figure 31 : Comparaison injections (a) analytique (mini-DE) et (b) préparative (midi-DE). Séparation de 4 alcaloïdes phénoliques à l'aide d'un système solvant composé de fractions légères de pétrole/acétate d'éthyle/éthanol/eau (2).

L'observation des résultats montre ici encore deux chromatogrammes analogues permettant de valider un transfert d'échelle réussi entre les deux colonnes hydrodynamiques (Figure 31). Cependant, comme dans l'exemple précédent, on peut s'interroger sur la qualité de séparation si le taux de phase stationnaire avait été optimisé sur la colonne préparative. L'espace disponible entre les pics aurait sûrement été plus grand, permettant alors d'injecter plus d'échantillon.

En système hydrostatique (CPC), le scale-up est plus compliqué car bien souvent non linéaire contrairement à ce qui a pu être observé sur les systèmes hydrodynamiques. En effet, d'une part la conception-même des colonnes fait qu'il n'est souvent pas possible de travailler à vitesse de rotation et débit imposés car la technique est tributaire de la pression qui ne peut être supérieure à 70 bar dans ce type d'appareil. D'autre part, les changements d'échelle sur système hydrostatique font souvent appel à un changement de taille et de design des cellules des rotors, influant directement sur la fluidique au sein de l'appareil. De ceci résultent des changements de comportement du système biphasique et ainsi des modifications de l'efficacité et du taux de phase stationnaire. Le scale-up ne peut donc pas être linéaire au rapport des volumes colonnes. Un exemple tiré de la littérature montre d'ailleurs qu'un rotor de volume plus important peut être plus performant qu'un rotor de petit volume, induisant un espace disponible supplémentaire entre les pics des composés à purifier (10).

Sutherland et al. (10) ont en effet tenté de reproduire l'expérience du scale-up linéaire sur système hydrostatique sur la séparation de deux protéines, la myoglobine et la lysozyme, en système solvant aqueux (système ATPS composé de PEG-1000 et de K_2HPO_4). Le transfert d'échelle est réalisé entre deux rotors hydrostatiques Armen Instruments de 500 mL et 6250 mL. Comme dans les autres cas, l'objectif est de réaliser une séparation identique entre les deux échelles, en un temps identique. La force

centrifuge est également maintenue constante. Le rapport des volumes colonne étant de 12,5, le débit est donc augmenté de 12,5, tout comme la quantité injectée.

Tableau 13 : Scale-up réalisé entre deux appareils hydrostatiques de 500 mL et 6250 mL (10).

	Analytique (petit rotor)		Préparative (gros rotor)
Vcolonne	500 mL	X 12,5	6250 mL
Débit	10 mL/min	X 12,5	125 mL/min
Rotations	2000 rpm	=	1293 rpm
Force centrifuge	224 g		224 g
Taux de phase stationnaire	40 à 20 %	<	53 à 24 %
Véchantillon	40 mL	X 12,5	500 mL
Masse injectée	176 mg	X 12,5	2200 mg
Résolution	1,28	<	1,88

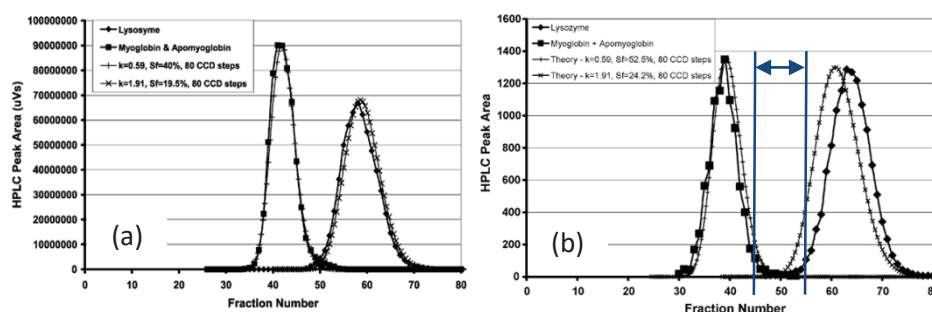


Figure 32 : Comparaison injections (a) analytique (petit rotor) et (b) préparative (gros rotor). Séparation de deux protéines (myoglobine et lysozyme) à l'aide d'un système solvant ATPS (10).

Le Tableau 13 montre qu'à force centrifuge constante et à débit multiplié par le rapport des volumes colonne, la séparation réalisée à grande échelle comporte une meilleure résolution que celle à petite échelle (Figure 32). On note donc ici que l'espace disponible supplémentaire sur le rotor de grande échelle aurait pu être comblé par l'injection d'une quantité plus importante d'échantillon.

A travers les différents exemples cités ci-dessus, plusieurs aspects ont pu être mis en avant. Tout d'abord, il apparaît que le scale-up sur systèmes hydrodynamiques reste relativement simple à mettre en place. D'autre part, sur les systèmes hydrodynamiques comme hydrostatiques, les auteurs se sont à chaque fois attaché à essayer de garder le taux de phase stationnaire constant. Ceci est malheureusement souvent difficile à réaliser et à prédire à cause de contraintes instrumentales. De même, le débit est à chaque fois fixé de manière stricte en fonction du rapport des volumes colonnes utilisées pour effectuer le scale-up. Les séparations ont ici été possibles, mais il peut arriver que le débit à appliquer sur la plus grosse colonne soit trop important pour retenir la phase stationnaire. Cette contrainte devient alors limitante et empêche le transfert. Dans tous les cas, il semble essentiel de pouvoir prédire la quantité exacte d'échantillon à injecter sur une colonne en fonction des conditions opératoires choisies. Ainsi, il deviendrait possible pour l'utilisateur de sélectionner les conditions opératoires en fonction de l'appareillage qu'il possède et de son objectif de production.

Dans le but de travailler aux meilleures performances de chaque rotor, la méthodologie de scale-up que nous avons choisi de mettre en place en CPC est indépendante des conditions opératoires, ces dernières pouvant ainsi être choisies en fonction des objectifs de l'utilisateur. Cette méthodologie repose sur une stratégie en 3 étapes, basée sur la notion d'espace disponible entre les solutés à purifier et la quantité maximale d'échantillon qui peut être injectée sur le rotor.

2. Présentation de la méthodologie proposée

La méthodologie que nous proposons pour le transfert d'échelle en CPC hydrostatique est basée sur l'observation expérimentale du comportement de chaque instrument : elle consiste à mesurer l'espace disponible ΔV (en mL) entre deux pics Gaussiens sur chaque rotor afin d'en déduire un facteur de scale-up. Une étude de charge sur le rotor analytique ainsi que l'utilisation du facteur de scale-up calculé en amont permettent alors d'en déduire la quantité maximale directement injectable sur le rotor de production, en faisant l'hypothèse que la concentration de l'échantillon reste assez faible pour être dans la partie linéaire de l'isotherme de partition de chaque composé. Cette méthodologie est schématisée Figure 33.

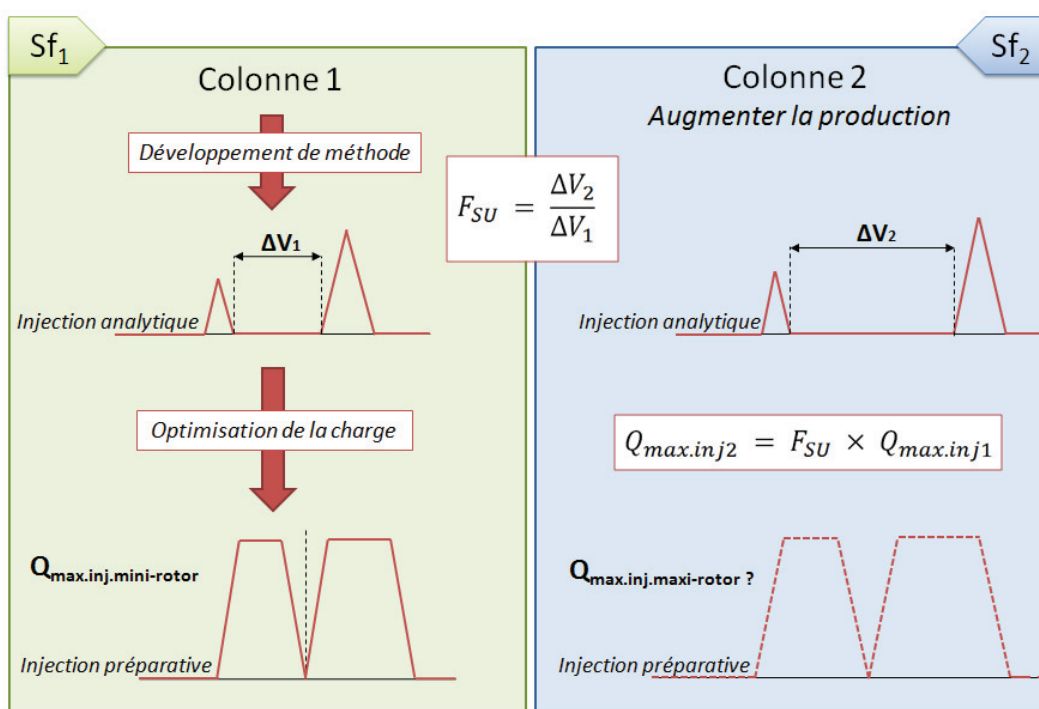


Figure 33 : Méthodologie de scale-up proposée au laboratoire.

Dans cette étude, les conditions opératoires utilisées sont indépendantes d'un rotor à l'autre. Ceci permet d'utiliser le rotor de grande échelle dans des conditions opératoires choisies par l'utilisateur exclusivement en fonction des contraintes instrumentales et des objectifs de production, et donc indépendamment des conditions opératoires développées en amont sur la colonne de plus petit volume.

Afin d'en démontrer le concept, nous avons appliqué cette méthodologie à la séparation de trois solutés test et au transfert de cette séparation d'un rotor 35 mL (colonne analytique) à un rotor 254 mL (colonne semi-préparative). Ces travaux ont donné lieu à une publication dans *Journal of Chromatography A*

reproduite dans ce chapitre. Afin d'en étayer le propos, le matériel utilisé sera brièvement rappelé, ainsi que les critères nous ayant conduit à sélectionner notre séparation test. Puis la publication sera présentée et complétée. Un second transfert sera ensuite réalisé avec les mêmes solutés test sur un rotor 88 mL afin de démontrer que la méthodologie est applicable sur des rotors de design, de volume et de nombre de cellules différent.

La seconde partie de ce chapitre sera consacrée à l'application de la méthodologie de transfert sur un cas réel. En effet, nous avons souhaité démontrer ses potentialités sur l'injection d'un échantillon complexe telle que l'extrait de romarin dont la méthode de purification a été développée au cours du chapitre 2. Dès lors, un transfert vers un rotor d'échelle industrielle de 812 mL sur lequel un développement de méthode aurait été impossible sera réalisé afin de montrer que l'augmentation du volume colonne permet une augmentation de productivité non négligeable.

3. Matériel et méthodes

3.1. Matériel

L'instrument utilisé est le même bâti FCPC-A Kromaton Rousselet-Robatel (Annonay, France) que celui utilisé lors du chapitre 2, pour lequel il est possible de changer les rotors en fonction du volume avec lequel on veut travailler. Tandis que le développement de méthode sera réalisé sur le rotor 35 mL, suivant l'application, le changement d'échelle sera effectué sur trois rotors de volumes et designs de cellules différents : 88 mL, 254 mL et 812 mL (Tableau 14).

Tableau 14 : Descriptif et caractéristiques des rotors Kromaton utilisés pour cette étude.

Nom	CPC25	CPC80	CPC200-1	CPC1000-2
Référence	K30159A	K30268A	K30116	K30247
Volume expérimental	35 mL	88 mL	254 mL	812 mL
Nombre de disques	13	7	20	24
Nombre de cellules	832	406	840	600

Les périphériques utilisés sont les mêmes que ceux décrits dans le chapitre 2 (pompe, détecteur UV et refroidisseur). Un autre détecteur UV Shimadzu SPD-6A sera parfois utilisé sur certains essais en remplacement du détecteur Armen Instruments pour cause de panne de ce dernier. Une attention particulière a été portée sur l'utilisation de cet autre détecteur uniquement sur des expériences où une modification de la réponse en termes d'intensité n'a pas d'impact.

Les différents produits chimiques utilisés dans ce chapitre sont listés dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Liste des produits chimiques utilisés

Produits chimiques	CAS	Fournisseur	Pureté
Heptane	142-82-5	Sigma Aldrich	≥ 99 %
Acétate d'éthyle	141-78-6	Sigma Aldrich	≥ 99,7 %
Méthanol	67-56-1	Sigma Aldrich	≥ 99,9 %
Méthyl t-butyl éther	1634-04-4	Sigma Aldrich	≥ 99,0 %
Ethanol	64-17-5	Sigma Aldrich	≥ 96 %
New coccine red	2611-82-7	Sigma Aldrich	75 %
Aspirine	50-78-2	Sigma Aldrich	≥ 99,0 %
Coumarine	91-64-5	Sigma Aldrich	≥ 99 %
Extrait sec romarin	-	Cooper industries	-

3.2. Préparation des échantillons à purifier

3.2.1. Mélange de solutés Guess

Une solution mère à 87 mg/mL composée d'un mélange de 3 composés Guess (new coccine red, aspirine et coumarine) est préparée dans la phase mobile (= phase inférieure aqueuse) du système solvant utilisé dans les différents essais : le système Arizona M composé d'heptane/acétate d'éthyle/méthanol/eau en proportions 5/6/5/6 (v/v). La solution mère est préparée par dissolution des composés à des concentrations de 2 mg/mL de new coccine red, 60 mg/mL d'aspirine et 25 mg/mL de coumarine.

Les injections analytiques sont réalisées avec une solution travail issue de la solution mère diluée par 7,5. Sa concentration est de 11,5 mg/mL soit environ 0,3 mg/mL de new coccine red, 8 mg/mL d'aspirine et 3 mg/mL de coumarine.

3.2.2. Extrait de romarin

L'extrait de romarin est préparé comme indiqué dans le chapitre 2. L'extrait éthanolique initial est dissous à 500 mg/mL dans la phase stationnaire inférieure du système solvant heptane/MTBE/éthanol/eau en proportions 4/1/4/1 (v/v). Le mélange est ensuite placé durant 10 minutes aux ultrasons afin de solubiliser un maximum de solutés. Le mélange comportant encore une grande quantité d'extrait non dissous, une centrifugation est effectuée à 5000 rpm durant 3 minutes afin de déposer les composés non solubles au fond du tube et de récupérer les molécules solubilisées dans la partie supérieure. La solution contient 181 mg d'extrait dissous/mL (cf. Chapitre 2, § 4.3.1).

4. Résultats et discussion

4.1. Mise en place de la méthodologie sur une séparation-modèle

4.1.1. Sélection des différents constituants de la séparation-modèle

Afin de réaliser la preuve de concept de la méthodologie de scale-up que nous souhaitons mettre en place, une méthode sera développée sur la séparation de solutés tests. Un mélange de plusieurs solutés sera réalisé afin de les séparer sur un appareil CPC de petite échelle (35 mL). La méthode sera ensuite optimisée puis transférée sur des appareils de volumes plus importants.

Les solutés test choisis font partie d'une sélection de 21 produits naturels d'une large gamme de polarité appelés composés Guess, très souvent utilisés dans le but de tester et comparer les propriétés de différents systèmes solvants (11-13). Le choix dans les solutés Guess séparés par CPC est porté sur un nombre de 3, dont un soluté non retenu, le new coccine red, utilisé comme marqueur de temps mort afin de pouvoir estimer le taux de phase stationnaire au sein de la colonne. Les deux autres solutés sélectionnés, l'aspirine et la coumarine, seront considérés comme les composés à purifier. Les coefficients de partage des deux composés retenus devront être compris entre 0,4 et 2,5 (ou log P compris entre -0,4 et 0,4), zone de coefficient de partage appelée « sweet-spot ». Le « sweet-spot » est une zone de coefficients de partage proposée par Friesen et Pauli, considérée comme la plage présentant la meilleure séparation en restant dans des temps de purification courts (12). Friesen et Pauli ont étudié de manière très complète la séparation des composés Guess à l'aide d'un système solvant très connu des utilisateurs de chromatographie liquide-liquide : le système hexane/acétate d'éthyle/méthanol/eau appelé HEMWat (12) dont la composition est rappelée Tableau 16.

Tableau 16 : Composition du système solvant HEMWat (12).

HEMWat system #	Hexane (H)	EtOAc (E)	Methanol (M)	Water (Wat)	Volume ratio (U/L)	Settling time (seconds)
-7	9	1	9	1	0.72	11
-6	8	2	8	2	0.73	13
-5	7	3	7	3	0.69	13
-4	7	3	6	4	0.76	10
-3	6	4	6	4	0.68	14
-2	7	3	5	5	0.83	18
-1	6	4	5	5	0.76	22
0	5	5	5	5	0.71	27
+1	4	6	5	5	0.68	21
+2	3	7	5	5	0.67	28
+3	4	6	4	6	0.83	20
+4	3	7	4	6	0.83	18
+5	3	7	3	7	0.91	30
+6	2	8	2	8	0.93	33
+7	1	9	1	9	0.91	15
+8	0	10	0	10	0.95	10

Basés sur les mêmes solvants (l'hexane étant remplacé par l'heptane pour limiter la toxicité), le système Arizona (Tableau 17) combine deux systèmes solvants binaires : le système polaire acétate d'éthyle/eau en proportions 1/1 (v/v) et le système heptane/méthanol 1/1 (v/v), beaucoup moins polaire (14-16)

Tableau 17 : Composition des 23 systèmes solvants Arizona (16).

Letter	v/v/v/v				Initial % v/v				Upper/lower phase ratio	Settling time (s)
	Heptane	Ethyl acetate	Methanol	Water	Heptane	Ethyl acetate	Methanol	Water		
A	0	1	0	1	0.0	50.0	0.0	50.0	0.88	36
B	1	19	1	19	2.5	47.5	2.5	47.5	0.92	31
C	1	9	1	9	5.0	45.0	5.0	45.0	0.965	28
D	1	6	1	6	7.1	42.9	7.1	42.9	0.96	29
F	1	5	1	5	8.3	41.7	8.3	41.7	0.95	30
G	1	4	1	4	10.0	40.0	10.0	40.0	0.95	25
H	1	3	1	3	12.5	37.5	12.5	37.5	0.945	25
J	2	5	2	5	14.3	35.7	14.3	35.7	0.91	20
K	1	2	1	2	16.7	33.3	16.7	33.3	0.88	21
L	2	3	2	3	20.0	30.0	20.0	30.0	0.84	18
M	5	6	5	6	22.7	27.3	22.7	27.3	0.80	17
N	1	1	1	1	25.0	25.0	25.0	25.0	0.70	22
P	6	5	6	5	27.3	22.7	27.3	22.7	0.69	21
Q	3	2	3	2	30.0	20.0	30.0	20.0	0.68	20
R	2	1	2	1	33.3	16.7	33.3	16.7	0.68	18
S	5	2	5	2	35.7	14.3	35.7	14.3	0.70	15
T	3	1	3	1	37.5	12.5	37.5	12.5	0.735	14
U	4	1	4	1	40.0	10.0	40.0	10.0	0.76	14
V	5	1	5	1	41.7	8.3	41.7	8.3	0.78	14
W	6	1	6	1	42.9	7.1	42.9	7.1	0.775	13
X	9	1	9	1	45.0	5.0	45.0	5.0	0.77	11
Y	19	1	19	1	47.5	2.5	47.5	2.5	0.71	10
Z	1	0	1	0	50.0	0.0	50.0	0.0	0.45	10

Afin de sélectionner le système solvant adéquat pour la séparation des 3 composés Guess sélectionnés, le Tableau 18 retrace la correspondance entre les systèmes HEMWat compris entre 0 et +3 et le système Arizona ainsi que les valeurs des coefficients de partage de l'aspirine et de la coumarine correspondants.

Tableau 18 : Correspondances entre le système HEMWat et le système Arizona et calcul des coefficient de partage prévisionnels selon les log P issus des travaux de Friesen et Pauli (12).

Système HEMWat	0		+ 1		+ 2		+ 3	
Correspondance Arizona	N		M				L	
	Log P	Kd	Log P	Kd	Log P	Kd	Log P	Kd
Aspirine (A)	-0,2	0,63	- 0,1	0,79	0,05	1,12	0,2	1,58
Coumarine (M)	0,1	1,26	0,2	1,58	0,3	1,99	0,5	3,16

L'observation du Tableau 18 montre que le système solvant HEMWat +3 peut être éliminé car la coumarine n'est pas comprise dans le « sweet-spot » puisque le log de P est supérieur à 0,4. L'aspirine et la coumarine sont en revanche bien comprises dans le « sweet-spot » pour les systèmes HEMWat 0, +1 et +2. Comme un marqueur de temps mort dont le Kd est égal à 0 est ajouté, nous choisissons de privilégier les systèmes +1 et +2 pour lesquels l'aspirine aura plus de chances d'être séparée du marqueur. Le système Arizona M étant compris entre le système HEMWat +1 et +2, c'est ce dernier qui sera choisi. Le système Arizona M est un système composé d'heptane/acétate d'éthyle/méthanol/eau en proportions 5/6/5/6 (v/v) dont la composition des phases supérieures et inférieures est indiquée dans le Tableau 19.

Tableau 19 : Composition en % (vol.) des phases supérieure et inférieure du système solvant Arizona M composée d'heptane/acétate d'éthyle/méthanol/eau en proportions 5/6/5/6 (v/v) (16).

	Phase supérieure	Phase inférieure
Heptane	54,6 %	0,07 %
Acétate d'éthyle	41,8 %	16,3 %
Méthanol	2,8 %	36,7 %
Eau	0,7 %	46,9 %

Afin de garder les valeurs de coefficient de partage telles qu'indiquées dans le Tableau 18, le système solvant sera utilisé en mode descendant, c'est-à-dire que la phase stationnaire sera la phase supérieure riche en heptane et la phase mobile sera la phase inférieure riche en eau.

Le marqueur de temps mort choisi, le new coccine red, est un composé très polaire (11) coloré en rouge. En mélangeant le new coccine red dans une petite quantité de phase supérieure et de phase inférieure du système Arizona M, la coloration rouge n'apparaît que dans la phase inférieure aqueuse. Le new coccine red ne se partageant pas dans la phase stationnaire (vérification également réalisée par spectrométrie UV), son utilisation en tant que marqueur de temps mort est donc validée.

Afin de valider les coefficients de partage et vérifier l'ordre de sortie des solutés, les composés dilués dans la phase mobile sont injectés individuellement à 1800 rpm et 5 mL/min sur le rotor 35 mL. En se basant sur le new coccine red qui marque le temps mort et donc le volume mort, l'aspirine apparaît avec un coefficient de partage de 0,7 tandis que la coumarine apparaît avec un coefficient de partage de 2. Les trois solutés sont ensuite injectés ensemble afin de valider la séparation (Figure 34).

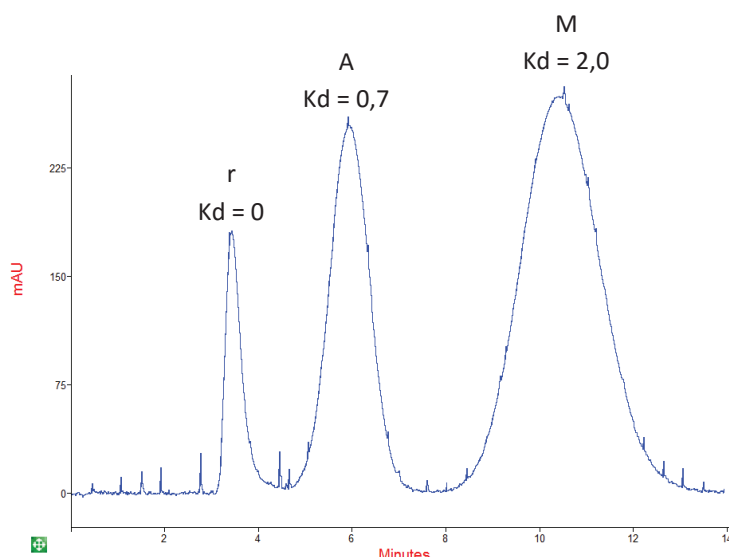


Figure 34 : Injection 0,5 mL new coccine red (r) 0,3 mg/mL, aspirine (A) 8 mg/mL et coumarine (M) 3 mg/mL, 1800 rpm, 5 mL/min, $P = 39$ bar, système solvant Arizona M, mode descendant. $V_{\text{colonne}} = 35$ mL, $S_f = 50,3$ %. $K_{d_r} = 0$, $K_{d_A} = 0,7$, $K_{d_M} = 2,0$. Détection UV 254 nm.

La résolution entre le pic d'aspirine et celui de coumarine est de 1,91. Cette résolution étant supérieure à 1,5 et ces deux pics étant bien séparés du pic de new coccine red, la séparation est validée.

Le choix des conditions opératoires peut à présent être effectué. Les critères suivants ont été déterminés afin d'aider au choix de la vitesse de rotation : un taux de phase stationnaire le plus élevé possible, pas

de phénomène de perte de phase stationnaire, une efficacité la plus élevée possible et une pression inférieure à 70 bar pour ne pas endommager les joints rotatifs de l'appareil. Pour cela, la vitesse de rotation doit être la grande possible car plus la vitesse de rotation est élevée, plus l'efficacité est importante (17-19).

L'injection de 1 mL de new coccine red dissous à 0,5 mg/mL dans la phase mobile du système Arizona M est réalisée à différentes vitesses de rotation pour un débit de 5 mL/min afin d'évaluer le taux de phase stationnaire et la pression engendrée (Figure 35). L'observation des graphiques montre que le taux de phase stationnaire reste relativement constant, avec une diminution plus importante à forte vitesse de rotation. Ce phénomène est probablement dû à un échauffement du système lorsque le rotor tourne plus vite, engendrant une modification de la solubilité et donc de la composition des phases et ainsi une perte de phase stationnaire. La pression quant à elle augmente régulièrement en fonction des rotations, avec une pression légèrement supérieure à 70 bar à 2600 rpm. Le choix de la vitesse de rotation est donc porté sur 2400 rpm, la vitesse la plus élevée tout en restant en dessous de 70 bar.

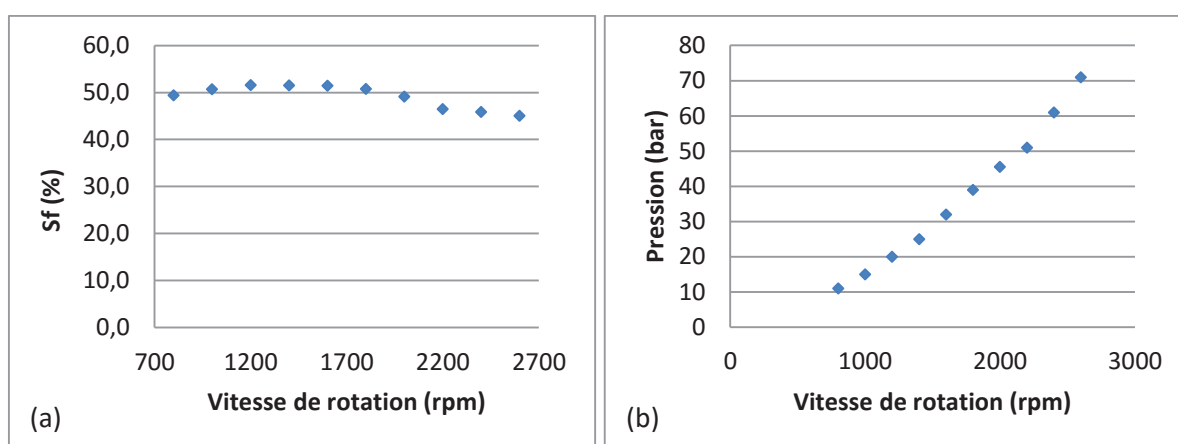


Figure 35 : Variation (a) du taux de phase stationnaire (%), (b) de la pression (bar), en fonction de la vitesse de rotation en rpm lors de l'injection de 1 mL de new coccine red à 0,5 mg/mL dissous dans la phase mobile du système solvant Arizona M. Débit = 5 mL/min, détection UV 254 nm.

La variation du débit ne sera pas étudiée ici. En effet, en modifiant le débit, l'utilisateur joue principalement sur la productivité en diminuant le temps de purification. Or ce rotor analytique n'a vocation qu'à permettre à l'opérateur de développer la méthode de purification et n'a donc pas un objectif de production. Un débit 5 mL/min est donc conservé car il permet un taux de phase stationnaire correct (> 45 %).

Une injection analytique de 0,5 mL de la solution mère de new coccine red, aspirine et coumarine diluée par 7,5 à 2400 rpm et 5 mL/min est réalisée afin de valider la séparation dans ces conditions opératoires.

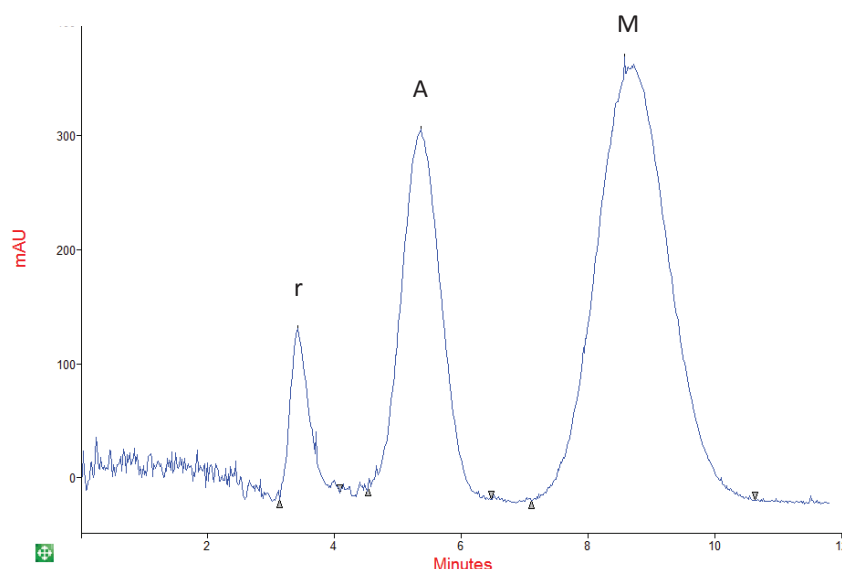


Figure 36 : Injection 0,5 mL de la solution mère diluée par 7,5 de new coccine red (r), aspirine (A) et coumarine (M), 2400 rpm, 5 mL/min, P = 54 bar, système solvant Arizona M, mode descendant. $V_{\text{colonne}} = 35 \text{ mL}$, Sf = 50 %. Détection UV 254 nm.

L'observation des résultats (Figure 36) permet de valider la séparation puisque la résolution entre le pic d'aspirine et de coumarine est de 2,00 et qu'ils sont tous les deux séparés du pic de new coccine red. L'optimisation de la quantité d'échantillon à injecter peut donc à présent être réalisée lors d'une étude de charge puis transférée sur des rotors de plus grande taille.

4.1.2. Méthodologie pour le transfert d'échelle en CPC : concept et scale-up d'un petit rotor de 35 mL vers un rotor 254 mL

Cette section est présentée sous la forme d'une publication décrivant la nouvelle méthodologie de scale-up que nous avons mis en place au sein du laboratoire.

La méthodologie est réalisée sur le transfert d'une méthode développée sur la séparation de trois solutés tests, d'un rotor 35 mL (rotor analytique) à un rotor 254 mL (rotor semi-préparatif). Dans un premier temps, les expériences sont exclusivement concentrées sur l'application de la méthodologie à conditions opératoires données. Une seconde partie est ensuite consacrée à la recherche des conditions opératoires optimales en fonction de l'objectif de production : charger une quantité maximale d'échantillon sur une opération ou améliorer la productivité en augmentant le débit. Ces notions seront développées de manière plus approfondie en section 4.1.3.



Scale-up in centrifugal partition chromatography: The “free-space between peaks” method

Elodie Bouju^{a,b}, Alain Berthod^a, Karine Faure^{a,*}

^a Institut des Sciences Analytiques, Université de Lyon 1, CNRS, 5 rue de la Doua, 69100 Villeurbanne, France

^b Kromaton Sarl, groupe Rousselet-Robatel, 45 Avenue Rhin et Danube, 07100 Annonay, France



ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 May 2015

Received in revised form 29 June 2015

Accepted 5 July 2015

Available online 10 July 2015

Keywords:

Centrifugal partition chromatography

Counter-current chromatography

Scale-up

Preparative chromatography

Productivity

ABSTRACT

Centrifugal Partition Chromatography (CPC) is a purification technique using a biphasic liquid system. As a preparative separation technique, scale-up is of primary concern. Once the separation is optimized on a lab-scale instrument, the scale-up transfer is quite straightforward simply using the instrument volume ratio as the linear transfer factor, thanks to the absence of solid support. Such linear transfer underestimates the performances of large-scale CPC rotors that are usually better than that of small rotors. It means that more material than predicted by the linear estimation could be purified. A fully practical method based on experimental observations is proposed. The first step is to determine experimentally the free space volume available between the two peaks of interest doing two analytical separations, one with the small analytical CPC instrument, giving ΔV_1 , and the second with the large preparative one, giving ΔV_2 . The second step is to determine on the small CPC instrument how much material can be loaded to reach the maximum mass load still giving the required purity and recovery ratio of the desired compound. Then, an accurate prediction of the maximal quantity of sample that the large-scale rotor can purify is simply obtained by multiplying the maximum mass load on the analytical CPC instrument by the free-space between peaks $\Delta V_2/\Delta V_1$ ratio. For demonstration purposes, the method is applied to the transfer of the CPC separation of a synthetic three-GUESS-compound mixture from a 35 mL-rotor to a semi-prep 239-mL rotor. The paper addresses also the operating condition optimization depending on industrial production strategy (maximal load per run or maximal productivity).

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Counter-current chromatography (CCC) is a liquid–liquid chromatographic technique, i.e. it requires only two immiscible liquid phases with no need for solid support [1,2]. One of the liquid phases is the stationary phase, maintained in the column by centrifugal forces. The other one is the mobile phase, pumped through the stationary phase.

Since CCC development in the mid-1960s by Yoichiro Ito [3], numerous column designs were conceived. However, only two designs were developed and commercialized: the hydrodynamic and hydrostatic systems [4]. Hydrodynamic systems are composed of Teflon tubing coiled on bobbins with two axes of rotation which generate variable centrifugal fields. On the contrary, hydrostatic systems, named Centrifugal Partition Chromatographs (CPC), are composed of steel disks stacked in a rotor spinning around a single

rotation axis (constant centrifugal field). Inside each disk, interconnected cells of different shape and/or volume are engraved.

Due to the liquid stationary phase, CCC has numerous advantages compared to classic solid phase chromatography techniques, such as higher load capacity and no solute infinite retention [5]. However, despite a relatively lower solvent consumption in CCC, method development in high capacity rotors is not economically viable yet. Thus, manufacturers have recently introduced small columns for faster method development and optimization [6]. The purpose of these small volume instruments is to allow for the rapid development of the separation using minimal amounts of solvents and then to scale-up by transferring the optimized separations to higher column volumes for increased production.

Up to now, CCC scaling-up is usually performed at constant stationary phase retention ratio. Once the method developed on a small column volume is optimized, a scale-up factor is used to estimate the conditions required to work with the higher column volume. With hydrodynamic systems, due to the tube configuration of the apparatus, the scale-up factor can be calculated according to the ratio of the columns volumes or the ratio of the tube sections.

* Corresponding author.

E-mail address: karine.faure@isa-lyon.fr (K. Faure).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.020>

0021-9673/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

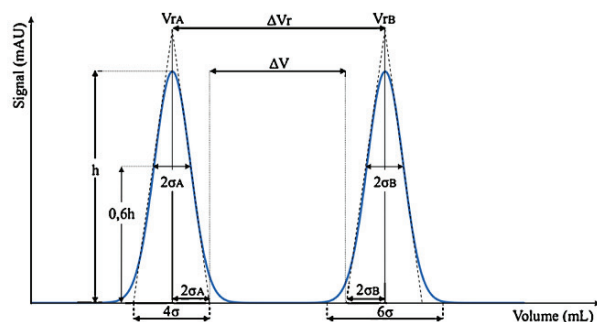


Fig. 1. Representation of the separation of two Gaussian peaks illustrating the concept of “free space between peaks”, ΔV , compared to the retention difference, ΔV_r , used in the definition of the chromatographic resolution.

Luo [7] performed an analytical separation of four phenolic alkaloids using an 18-mL CCC column. He then transferred it on a 50-times larger 900-mL column. The strategy consists in increasing the flow rate and the solutes load by the same scale-up factor defined as the column volume ratio: $900/18 = 50$. Results showed almost the same resolution because the stationary phase retention ratios were the same in the two CCC columns. However, this is not always the case: had the stationary phase retention been better on the preparative column, the resolution and the injected amount could have been higher. In hydrostatic systems, Sutherland [8] accomplished a scale-up example also using the ratio of the column volumes as the transfer factor. The myoglobin and lysozyme separation was optimized on a 500 mL hydrostatic column with an aqueous two-phase solvent system (ATPS). The transfer was performed on a 12.5 times larger column volume, i.e. 6.25 L working with a 12.5 times higher flow rate and injected protein amount. On this 6.25 L preparative separation, the protein resolution was greater than that observed for the 500 mL analytical separation: the sample load could have been increased significantly [8].

In these experiments, the scale-up factor based on the column volume ratio gives the flow rate and sample load to use on the larger column to have the same separation done in the same time. However, a better resolution is frequently observed with larger rotors, showing that a greater relative solute load could have been purified. Furthermore, it is often claimed that the scale-up factor must be determined for a similar stationary phase retention ratio in the small and large columns. This is not always feasible. In addition, it may be sometimes possible to work with higher stationary phase retention ratio in the larger rotors which might allow loading even more material on the preparative column.

The aim of this work is to develop a new practical scale-up methodology, in order to exactly predict the maximum loadable quantity in the large volume preparative rotor after optimization of a purification method on a small apparatus. This methodology will be developed on hydrostatic CPC columns but it should be adaptable to any device (hydrodynamic, hydrostatic) and with no parameter constraint. Several scaling-up issues will be covered: columns behavior, loading optimization, prediction of the maximal injectable load on the larger column and finally which column operating conditions should be specifically optimized to maximize productivity.

2. Experimental

2.1. Chemicals

All reagents were of analytical grade. Methanol, heptane and ethyl acetate were purchased from Sigma–Aldrich (Saint-Quentin

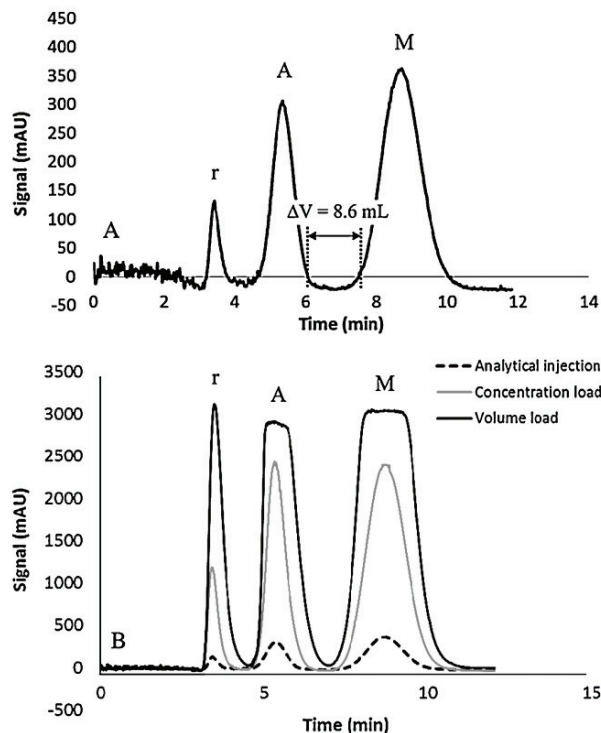


Fig. 2. (A) 35-mL rotor analytical injection of 0.36 mL (1% column volume) of 0.3 mg/mL new coccine red (r), 8.0 mg/mL aspirin (A) and 3.3 mg/mL coumarin (M) in descending mode. (B) 35-mL rotor optimization injections: analytical injection, concentration load and volume load. Solute concentrations, injected volumes and mass load are listed in Table 1. Column volume: 35 mL, descending mode, flow rate: 5 mL/min, system Arizona M, heptane/ethyl acetate/methanol/water 6/5/6/5 (v/v/v), 2400 rpm, stationary phase retention: 50%, 54 bar.

Fallavier, France) as well as the three solutes new coccine red, aspirin and coumarin.

2.2. Instrumentation

The instrument is a hydrostatic apparatus model, FCPC-A from Kromaton Rousselet-Robatel (Annonay, France) with interchangeable columns (or rotors). The smaller analytical column has a volume of 35 mL whereas the semi-preparative rotor has a 239-mL volume. The two rotors were made of 13 stacked disks each containing 64 cells (8-shaped also called twin cells) making a total of 832 interconnected cells. Each cell of the 35-mL rotor has a volume of 31 μ L with a connecting duct of 12 μ L making the total cell volume 25.8 mL and the duct volume 10 mL or 28% of the rotor volume. Since during the chromatographic process the duct volume contains only mobile phase, it can be considered as “dead” volume making the theoretical maximal S_f value of the 35-mL rotor being 72%. Each cell of the 239-mL rotor has a volume of 220 μ L with interconnecting duct of 67 μ L making a total cell volume 183 mL and the duct volume 56 mL or 23% of the rotor volume. The larger 239-mL could theoretically retain a better $S_f = 77\%$ of stationary phase.

A refrigerated circulator F10-C Julabo (Colmar, France) was used to cool down the CPC instrument flowing chilled water in the dedicated lines. A Spot Prep II integrated system from Armen Instruments (Saint-Avé, France, a division of Gilson USA) was used. This equipment is the assembly of a quaternary pump (flow rate from 5 to 250 mL/min, maximal pressure 230 bar), an automatic

Table 1

Solute concentrations in mg/mL, injected volumes and masses during analytical injection, concentration load and volume load as illustrated by Fig. 2.

Solutes	Composition and concentration in mg/L of solutions used for:		
	Analytical injection	Concentration load	Volume load
New coccine red [r]	0.3	2.0	2.0
Aspirin [A]	8.0	25.0	25.0
Coumarin [M]	3.3	60.0	60.0
Inj. vol. (mL)	0.36	0.36	1.4
Total injected mass (mg)	4	31	122

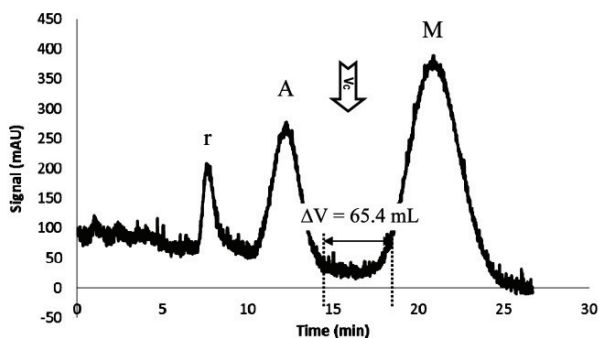


Fig. 3. 239-mL rotor analytical injection of 0.3 mg/mL of new coccine red (r), 8.0 mg/mL aspirin (A) and 3.3 mg/mL coumarin (M). Column volume: 239 mL, injection volume 2.5 mL (1% column volume), injected mass: 29 mg, flow rate: 15 mL/min, rotational speed: 1800 rpm, stationary phase retention: 52%, $P = 54$ bar, descending mode, system Arizona M, heptane/ethyl acetate/methanol/water 6/5/6/5 (v/v). The vertical arrow points the $K = 1$ retention time (column volume).

loop injection valve fitted on a 10 mL or a 50 mL sample loop, a UV/VIS spectrophotometer dual wavelength set up at 254 nm and 280 nm and a fraction collector. The Armen Glider Prep software installed in the integrated computer with touch-screen allows for full apparatus control and data acquisition.

2.3. Centrifugal partition chromatography process

The rotor to be used, either the 35-mL small rotor or the semi-prep 239-mL rotor, was installed inside the FCPC-A equipment and rinsed with the solvent system to be employed for the tests. The refrigerated circulator was regulated at 0 °C to cool the FCPC-A chamber whose temperature would otherwise increase due to heat generated from rotary seals.

All experiments were performed using a three-component mixture: new coccine red (r), aspirin (A) and coumarin (M). These three test solutes belong to the GUESS list of compounds defined by Friesen [9–11]. The GUESS list is a selection of 21 natural products of very different polarities, usually used for solvents systems polarity range determination. A stock solution was prepared in mobile phase with concentrations of 2 mg/mL new coccine red, 60 mg/mL aspirin and 25 mg/mL coumarin.

The selected solvent system of all experiments was the HEMWat Arizona M system [12], composed of heptane, ethyl acetate, methanol and water, in proportion of 6/5/6/5 (v/v). This solvent system was used on descending mode (non-polar stationary phase). In this M solvent system the solutes partition coefficients were 0 for new coccine red [r], a hold-up or “dead” volume marker, 0.5 for aspirin [A] and 1.5 for coumarin [M]. For a given experiment, the rotor was entirely filled with the upper stationary phase at 600 rpm to have a homogeneous solvent re-equilibration on the rotor. Then the rotation was set up at the higher speed needed for appropriate stationary phase retention. The rotational speed is chosen to have: (i) the highest stationary phase retention during injection and

analysis, (ii) no flooding phenomenon and (iii) good chromatographic efficiency [13–15]. For each column, it corresponds to the maximal rotational speed that will generate a mobile phase driving pressure lower than 80 bar, the rotary seal pressure limit of our equipment. The rotation speed was 2400 rpm for the 35-mL rotor, producing a gravitational field of $648 \times g$ and 1800 rpm for the 239-mL heavier rotor, producing a smaller field of only $365 \times g$. The proposed scale-up methodology does not require gravitational fields to be the same between columns as explained later.

After the working rotational speed was set up, the lower aqueous mobile phase was pumped through the stationary phase in the descending mode until the equilibrium was reached, i.e. when only the lower mobile phase came out of the column and the 254 nm UV signal baseline stabilized. The choice of the mobile phase flow rate had, amongst others, a large influence on the purification duration and the stationary phase retention ratio. The flow rate could be high to shorten purification time but increasing flow rate leads to decreasing stationary phase retention, so a compromise must be found.

The stationary phase retention S_f is calculated by the ratio of the stationary phase volume (V_s) and the column volume (V_c): $S_f = V_s/V_c$. The stationary phase volume (V_s) is deduced from the overall column (V_c) using the mobile phase volume (V_m), measured by injection of the new coccine red, a non-retained compound on this solvent system: $V_s = V_c - V_m$. For each rotor, flow rates are chosen to have at least a 50% stationary phase retention ($S_f = 0.5$), with short purification times (detection of the most retained compound in less than 30 min).

Two types of injections were performed: analytical injections and preparative injections. Analytical injections consisted in the injection of a sample volume not higher than 1% column volume and a low sample concentration giving a signal/noise ratio ≥ 10 . In this way, the peaks had Gaussian appearance (Fig. 1). To satisfy the analytical conditions, the stock solution was diluted 7.5 times to have concentrations [r] = 0.3 mg/mL, [A] = 8.0 mg/mL and [M] = 3.3 mg/mL. Preparative injections were load-optimized injections: the injected concentration is increased to have the maximal quantity that can be injected on the rotor in the given experimental conditions. The injected solution concentration was raised up to the solubility limit of the less soluble compound to remain in the linear range of the isotherm. It corresponds in our case to the injection of the above stock solution with [r] = 2 mg/mL, [A] = 60 mg/mL (saturated solution) and [M] = 25 mg/mL.

3. Results and discussion

3.1. Free-space between peaks and maximal load

The aim of a preparative separation is to charge the maximum mass of sample on the column still recovering the largest amount of one or several compounds at a specified purity. The loading is raised increasing both the sample concentration and injected volume. For this purpose the concept of free-space available for loading is commonly used.

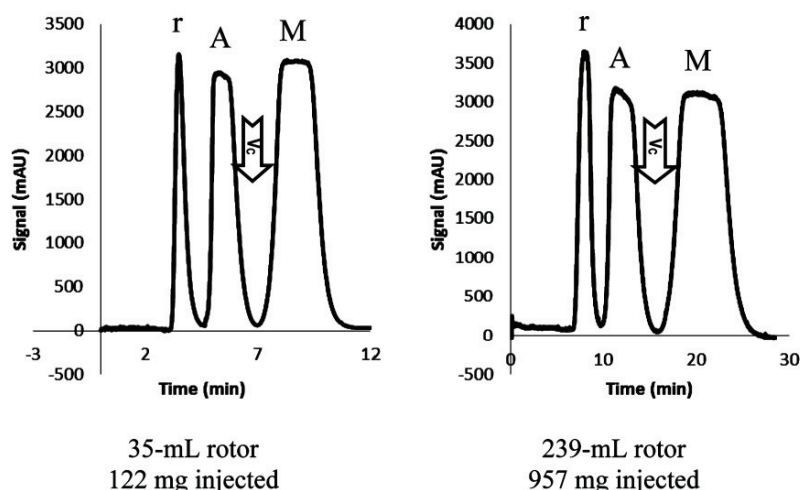


Fig. 4. (Left) 35-mL rotor preparative injections of 1.4 mL of the 2 mg/mL new coccine red (r), 60 mg/mL aspirin (A) and 25 mg/mL coumarin (M) solution in descending mode, flow rate: 5 mL/min; (right) 239-mL rotor preparative injection of 11 mL of the same solutions, flow rate: 15 mL/min, system Arizona M, heptane/ethyl acetate/methanol/water 6/5/6/5 (v/v). The vertical arrow point the $K = 1$ retention time (column volume). All other experimental conditions are listed in Table 2.

Table 2

Data for the “free-space between peaks” method using the three GUESS solute test mixture. Operating conditions of Fig. 4 scale-up example, including productivity capacities of the two columns for the model Guess mixture used.

	<i>Analytical reference</i>		<i>Fig. 4 preparative transfer (mass load)</i>		<i>Operating change transfer</i>		<i>Fig. 6 preparative transfer (productivity)</i>	
	35-mL rotor	Ratio	239-mL rotor	Ratio	35-mL rotor	Ratio	239-mL rotor	
V_{column}	35 mL	6.8	239 mL	1	35 mL	6.8	239 mL	
Flow rate	5 mL/min	3	15 mL/min	2.5	12.5 mL/min	2.8	35 mL/min	
Rotational speed	2400 rpm	–	1800 rpm	–	2400 rpm	–	1800 rpm	
Centrifugal field, g	648 m/s ²	–	365 m/s ²	–	648 m/s ²	–	365 m/s ²	
Pressure	54 bar	–	54 bar	–	54 bar	–	52 bar	
Stationary phase ratio, S_f	50%	–	52%	–	28%	–	42%	
Free space between peaks, ΔV	8.6 mL	$F_{\text{SU}} = 7.6$	65.4 mL	$F_{\text{SU}} = 0.56^a$	4.8 mL ^a	$F_{\text{SU}} = 11.8$	56.6 mL	
Maximum load, $Q_{\text{max, inj}}$	122 mg	7.8	957 mg	0.53	65 mg	11.8	766 mg	
Purification time	11.3 min	2.4	27.4 min	0.4	4.5 min	2.2	10.1 min	
Volume needed	56.5 mL	7.3	411 mL	1.0	56.3 mL	6.3	353 mL	
mg per mL and per h	11.5	0.4	5.1	1.3	15.4	0.8	12.9	
Productivity	648 mg/h	3.2	2095 mg/h	1.3	867 mg/h	5.2	4550 mg/h	

^a In transferring from the 35-mL rotor run at 5 mL/min ($\Delta V = 8.6$ mL) to the increased flow rate of 12.5 mL/min, the “free-space between peaks ΔV_2 is smaller (4.8 mL) producing a F_{SU} factor lower than 1 ($F_{\text{SU}} = 0.56$).

The free-space ΔV (Fig. 1) between two neighbor solute peaks A and B in analytical conditions can be written by:

$$\Delta V = \Delta V_r - 2(\sigma_A + \sigma_B) \quad (1)$$

ΔV is expressed in mL, σ is the volume standard deviation in mL and ΔV_r is the difference between the retention volumes of the most retained solute and the less retained solute in mL used in the definition of the resolution factor (Fig. 1). Statistically, 95% of the solute molecules can be found within the $4\text{-}\sigma$ baseline width. If one wishes to attain precision of 0.1%, a $6\text{-}\sigma$ baseline width can be used [16]. Because standard deviation calculation is carried out from Gaussian peaks, the ΔV value can only be estimated in analytical injections. Indeed, preparative injections produce band broadening and subsequent non Gaussian peaks on which standard deviation cannot be determined easily.

For any chromatographic system working with solid stationary phase, the maximal column loadability $V_{\text{max, inj}}$ is proportional to

the free-space ΔV that is available between two analytical solute peaks in the linear range of isotherms [17]. In CCC chromatographic systems with liquid stationary phase, partition isotherms are generally linear over a much wider range, since the limitations are solubility-linked. In this linear range, we hypothesized that:

$$Q_{\text{max, inj}} \propto \Delta V \quad (2)$$

A successful scale-up consists in having the same separation with the lab scale equipment and with the industrial scale one. In this way, for a specific desired purity, if the maximal injected quantity is noted $Q_{\text{max, inj}}$, this quantity can be determined working with a small analytical rotor as $Q_{\text{max, inj}1}$. Next, it should be possible to predict the high $Q_{\text{max, inj}2}$ load when working with a larger rotor.

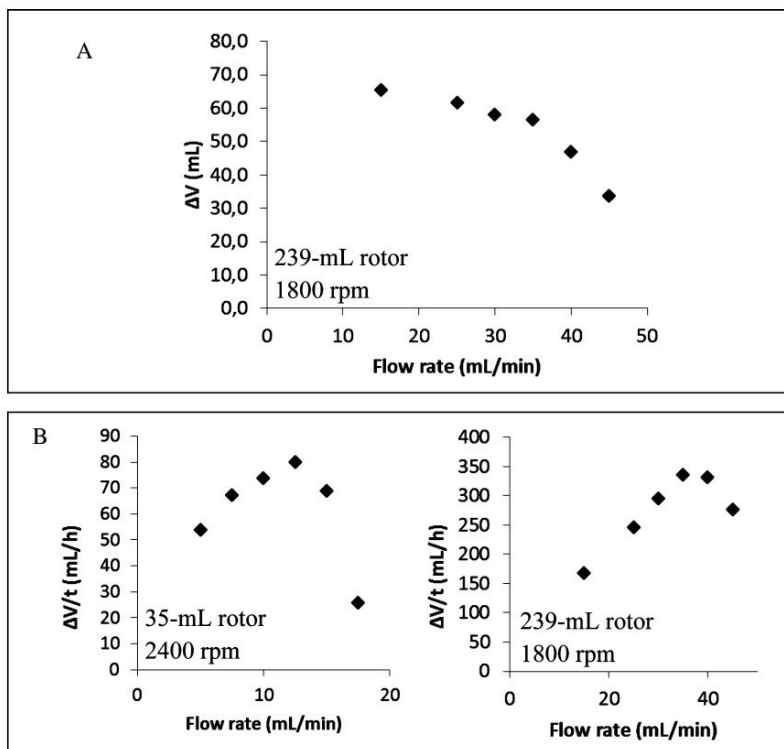


Fig. 5. Effect of the flow rate on the “free-space between peaks” interval. (A) Free-space between aspirin and coumarin peaks plotted versus the mobile phase flow rate at 1800 rpm on the 239-mL rotor (1 mL injection). (B) Evolution of the ratio of the free-space ΔV between aspirin and coumarin over the time needed to complete the separation. Left: 35-mL rotor at 2400 rpm with 0.5 mL injections; right: 239-mL rotor at 1800 rpm with 1 mL injections.

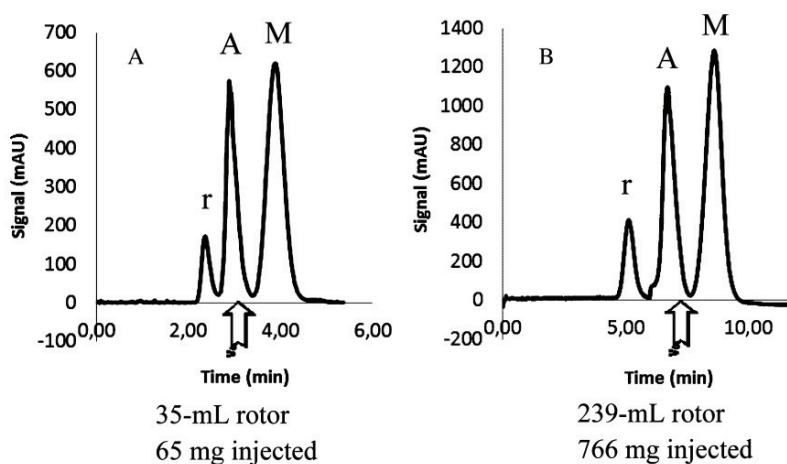


Fig. 6. The “free-space between peaks” optimization of the productivity factor. Injections of 2.0 mg/mL new coccine red (r), 60.0 mg/mL aspirin (A) and 25 mg/mL coumarin (M) solution in descending mode, system Arizona M, heptane/ethyl acetate/methanol/water 6/5/6/5 (v/v). (A) 35 mL rotor, injection volume: 0.75 mL and (B) 239-mL rotor preparative, injection volume: 8.8 mL. The vertical arrow points the $K=1$ retention time (column volume). All other experimental conditions are listed in Table 2.

Using Eq. (2) for the two rotor size considered, the ratio of the maximum injectable quantities is equal to the free-space between peaks ratio on the two columns:

$$\frac{Q_{\max, \text{inj}2}}{Q_{\max, \text{inj}1}} = \frac{\Delta V_2}{\Delta V_1} \quad (3)$$

provided that (i) the solute isotherms are in the linear range, (ii) temperature and stationary phases retention are constant for a given rotor.

Using the two free-space between peak ΔV for the two columns, it is possible to define a very simply the scale-up

factor, F_{SU} , that will take into account the actual behavior of the two columns:

$$F_{SU} = \frac{\Delta V_2}{\Delta V_1} \quad (4)$$

In this way, knowing the maximal injection quantity in the 35-mL rotor, the maximal injection load in the 239-mL rotor can be directly deduced:

$$Q_{\max, \text{inj}2} = F_{SU} \times Q_{\max, \text{inj}1} \quad (5)$$

3.2. Relationship between resolution R_s and free-space between peaks ΔV

It is important to establish clearly our concept of free space between peaks since chromatographers always use the resolution factor, R_s . In preparative chromatography, the Gaussian definition of the resolution factor is not used because it is not representative of the loadability of the column due to the non-Gaussian character of the peak profiles. However, the relationship between R_s and ΔV can be established. The chromatographic resolution equation is classically:

$$R_s = \frac{\Delta V_r}{(W_A + W_B)/2} \quad (6)$$

In which W is the Gaussian peak width at peak base, equal to 4σ . The resolution equation can be rewritten as:

$$R_s = \frac{\Delta V_r}{2(\sigma_A + \sigma_B)} \quad (7)$$

As illustrated by Fig. 1, the free-space ΔV between two solutes A and B can be written as:

$$\Delta V = \Delta V_r - 2\sigma_A - 2\sigma_B = 2(\sigma_A + \sigma_B) \times (R_s - 1) \quad (8)$$

As shown in the above equation, if $R_s = 1$, $\Delta V = 0$. Thus, the ΔV concept can only be used for a resolution $R_s > 1$. However, Eq. (8) is only valid with Gaussian peaks i.e. in analytical separations.

3.3. Free-space between peaks measurement and load optimization in the 35-mL rotor

In order to validate the proposed “free-space between peaks” method, a scale-up was realized between two CPC columns: an analytical 35 mL column and a larger, semi-preparative 239 mL column. The ratio of these two column volumes is 6.8. The tests were realized using a mixture of three GUESS compounds. New coccine red is a brightly red-colored unretained anionic compound that will be used for stationary phase retention determination. Aspirin and coumarin are two stable and easily UV detectable compounds that will allow for separation evaluation and ΔV calculation. These two last solutes were considered as the two model compounds for purification optimization aiming for 100% purity and 100% recovery i.e. baseline separations are required between aspirin and coumarin, even in preparative injections.

The first step was carried on the small 35-mL rotor. After method development (solvent system and operating conditions selection), an analytical injection of 1% column volume of the diluted solution of new coccine red, aspirin and coumarin was realized. The free-space between the aspirin and coumarin peaks was calculated for available space ΔV_1 estimation. Fig. 2A shows the analytical injection at 2400 rpm, 5 mL/min on the 35 mL mini-rotor. Under these conditions, the stationary phase retention ratio was 50% with a measured pressure of 54 bar. The partition coefficient of aspirin and coumarin between stationary and mobile phase were calculated as 0.55 and 1.52, respectively. The free-space ΔV_1 (Eq. (1)) between aspirin and coumarin was $\Delta V_1 = 8.6$ mL.

Once ΔV_1 is determined, the load optimization must be done with the same operating conditions. In conventional preparative chromatography, the load study is usually realized raising first the injected sample concentration and then the injected volume. In this way, dispersion is minimized [18,19]. According to Eq. (3), the stationary phase retention ratio, S_f , must be the same during analytical injections and preparative injections. So, the injected quantity should be increased without causing any stationary phase loss which is frequently observed when loading more material in a CPC column [20,21].

Fig. 2B shows three chromatograms of the loading study. The concentration load consists in injecting the stock solution while keeping the 1% column volume injection. The coumarin maximum solubility was reached and 31 mg GUESS sample was injected. The volume load was then increased until minimal baseline return between aspirin and coumarin (touching bands), hence having 100% purity and recovery. The observed flattening of the peaks is due to the large square injection of maximum concentration sample. Table 1 shows the three solute concentration, mass and injected volume details during the different injections. The maximal mass that can be injected is noted $Q_{\max, \text{inj}1}$ (35-mL rotor) = 122 mg.

3.4. Analytical injection in the 239-mL rotor: free-space between peaks measurement and scale-up factor calculation

With the larger instrument, the first step consists also in determining the free-space between peaks, ΔV_2 , in an analytical injection on the 239-mL rotor in order to deduce the scale-up factor F_{SU} between the two columns (Eq. (4)) and to predict the maximal injectable quantity. The free-space ΔV_2 and thus the scale-up factor are directly calculated on the rotor experimental behavior observations. Therefore, it is not necessary to restrain operating parameters to identical gravitational field or stationary phase retention ratio as observed in the literature [7,22,23] except temperature which is discussed later. The proposed “free-space between peaks” method allows the user to choose rotational speed and flow rate conditions according to its own specifications (pressure, solvent costs, duration and reducing equipment wear).

For illustration purposes, we set up the 239 mL rotor rotation speed at 1800 rpm and the mobile phase flow rate at 15 mL/min. These settings correspond to our instrument pressure limit acceptable for the rotary seals. Under these conditions, the stationary phase ratio was 52% for a 54 bar pressure. As for the 35-mL rotor, a 1% column volume (2.4 mL) of the diluted mixture of the three GUESS compounds (0.3 mg/mL new coccine red, 8.0 mg/mL aspirin and 3.3 mg/mL coumarin) was injected on the 239 mL rotor (Fig. 3). The free-space ΔV_2 between aspirin and coumarin was measured as 65.4 mL.

As required by Eq. (4), the scale-up factor between the 35-mL rotor and the 239-mL rotor was calculated as $F_{SU} = 65.4/8.6 = 7.6$. Hence, the maximal injection load value on the semi-prep 239-mL instrument is calculated from Eq. (5) as $Q_{\max, \text{inj}2} = 7.6 \times 122 = 926$ mg. We note that our F_{SU} scaling factor is 12% higher than the simple column volume ratio (239/35 = 6.8).

3.5. Comparing prediction and experimental results

The “free-space between peaks” method predicted a 926-mg maximal injectable quantity on the 239-mL rotor corresponding to an injection of 10.7 mL volume of the stock solution, and the developed chromatogram should be similar to that obtained on the small 35-mL rotor.

Fig. 4 shows the 926 mg preparative injection of 11 mL stock solution of the three GUESS solute mixture in comparison to the 122-mg preparative injection done with the analytical 35-mL instrument. The chromatograms are similar. A baseline return

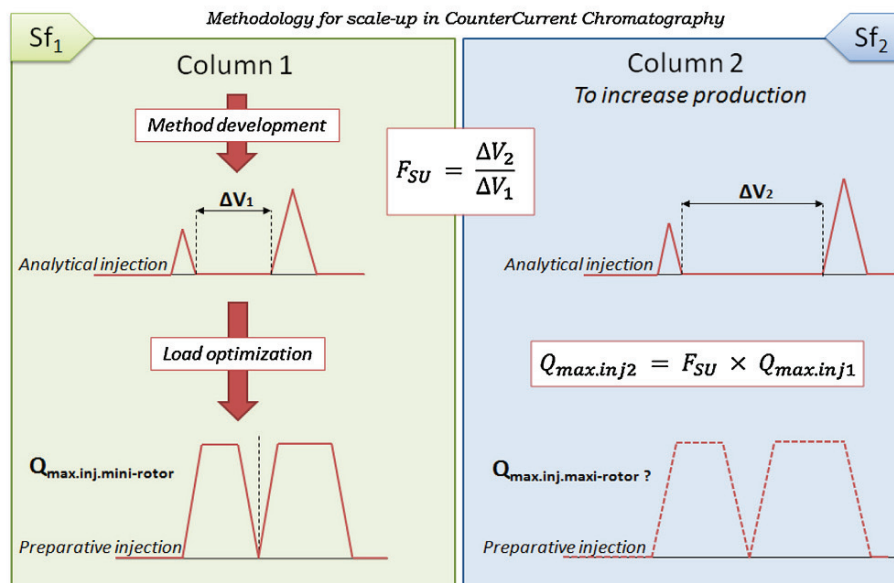


Fig. 7. Sketch for the “free-space between peaks” methods. The scaling-up is based on the experimentally measured free-space ΔV between solute peaks with the same liquid system used on the analytical column (Column 1) and the larger volume preparative column (Column 2). S_f1 and S_f2 are not necessary the same between columns. They must remain the same upon loading on a given column.

between the two peaks of interest is observed and the 100% purity and recovery criteria are both fulfilled. Therefore, for a 6.8 column ratio volume, it has been possible to inject 7.6 times more on the larger 239-mL rotor without constraint on the operating conditions (Table 2) other than equipment constraints (maximum pressure on the rotary seals and constant temperature). Under these operating conditions and through this methodology, it was possible to increase the productivity by a factor 3 from 648 mg/h on the 35-mL column to 2095 mg/h on the 239-mL column (Table 2).

If the simple experiments realized with a test mixture confirmed the hypothesis that the “free-space between peaks” ratio allows for the calculation of a scale-up factor with a loading study done on the analytical small instrument. This experimental scale-up factor permits one to predict the quantity that should be injected to have the same separation on the larger preparative column, with the same purity and the same recovery, adapting the operating conditions to the equipment used. Nevertheless, this prediction has some limitations: the temperature must be controlled during all injections (both rotors) and the stationary phase ratios (S_f factors) must be maintained between the analytical and preparative injections on the same rotor. Indeed, if the temperature varies, the solutes partition coefficients will change distorting the free-space between peaks ΔV volume. Similarly, if the S_f ratio is different between the analytical and the preparative injections on the same column due to stationary phase different bleed, the solutes retention volumes will be different and the scaling-up will be compromised. Eventually, in some particular cases, it is not possible to determine the ΔV value. If the resolution between the two peaks of interest is lower than 1, peaks overlap and there is no free-space between peaks and, obviously, no possible purification with 100% recovery.

3.6. Best operating conditions for maximal load or for maximal productivity

One of the most important points before scaling-up a purification method is the operating conditions that must be set up in the higher volume column according to industrial objectives. There are

two working strategies: the user can realize the purification in one large batch by loading a maximal sample quantity (maximal load per run) or can perform this purification in several smaller injections done faster to produce more quantity in less time (maximal productivity).

Two parameters can be adjusted with CPC columns: the rotor rotation speed and the mobile phase flow rate. Increasing the rotor rotation speed allows for a higher S_f and efficiency [13,14,24]. Increasing the mobile phase flow rate shortens the purification time and increases productivity.

For maximum stationary phase retention ratio, S_f , and efficiency, N , the rotor rotation speed should be the highest possible, limited by the motor capabilities but also by the experimental driving pressure that should stay below 80 bar in order to safeguard the rotating seals. The retention volume of a compound, V_r , is given by:

$$V_r = V_m + K_D \cdot V_s \quad (9)$$

in which V_m and V_s are respectively the mobile phase volume (or dead volume) and the stationary phase volume. K_D is the partition coefficient of the compound between the mobile phase and the stationary phase. Thus, the difference between the retention volumes of two compounds is:

$$\Delta V_r = V_s \cdot \Delta K_D \quad (10)$$

Combining Eqs. (1) and (10), we obtain:

$$\Delta V_r = V_C \cdot S_f \cdot \Delta K_D \quad (11)$$

Eq. (11) shows that ΔV_r is directly proportional to S_f . So, it seems that the maximum S_f is desirable to obtain the maximum ΔV_r . In our study, it confirms that the highest possible rotor rotation speed compatible with the pressure bearable by the rotary seals must be used producing the highest S_f . This is not always the case, injected solutes could modify this behavior leading to reduced rotation speed to avoid flooding. Since high rpm also produces thinner peaks (higher efficiency), it reduces the σ values in Eq. (1) also increasing the ΔV difference. This is another reason to work at the highest possible rotation speed.

The second adjustable parameter is the mobile phase flow rate. Fig. 5A shows the variation of ΔV as flow rate changes, for a 1 mL injection of the diluted solution of new coccine red, aspirin and coumarin on the 239-mL rotor (Gaussian conditions). As the flow rate increased, the free space between the aspirin and coumarin peaks gradually decreased. Indeed, despite an efficiency increase, the faster flow of mobile phase expels some stationary phase reducing S_f , hence reducing ΔV_f (Eq. (11)). Thus, to load a maximal sample amount in a single elution run, it is better to apply a lower flow rate to have a higher free-space between peaks of interest. For the 239-mL rotor and the maximum 1800 rpm possible speed, a 15 mL/min flow rate was therefore appropriate to realize the maximal load in one purification run as shown by Fig. 3.

The free-space between peaks ΔV value can also be related to the duration, t , of the purification. The ratio $\Delta V/t$ will give an idea of the column productivity. Fig. 5B shows the $\Delta V/t$ evolution versus the mobile phase flow rate during analytical injections (Gaussian conditions) on the 35-mL and 239-mL rotors. The plots show that there is an optimum flow rate for which the $\Delta V/t$ ratio and thus the productivity are maximal. At flow rates lower than the optimum, the ΔV value is larger so it is possible to load a larger amount of sample but the time needed to complete the separation is long so that the productivity is poor. At flow rates higher than the optimal value, the stationary phase loss is so important that the column cannot be highly loaded so that the productivity is also poor. The best productivity in the practical cases presented was obtained at 12.5 mL/min flow rate and 2400 rpm for the 35-mL rotor and 35 mL/min and 1800 rpm for the 239-mL rotor.

A new scale-up is realized between the 35-mL and 239-mL rotor using these two optimized flow rates that both were within the apparatus pressure limitations (<80 bar). First, the maximal load on the 35-mL rotor at 2400 rpm and 12.5 mL/min can be directly predicted by using our transfer method within the very same rotor but at different operating conditions. The ΔV value from the analytical injection (1% column volume and diluted solution) on the 35-mL column at 2400 rpm and 12.5 mL/min was measured as 4.8 mL. Comparing with the previous results at 5 mL/min, the ΔV ratio in these two flow rates conditions gives a transfer factor, F_{SU} , of 0.56 (Table 2) a value lower than 1 because the ΔV_2 volume is lower than the ΔV_1 volume (Eq. (4)). The reduced 4.8 mL “free-space between peaks” observed at the higher 12.5 mL/min flow rate is predicted to produce a reduced maximal injectable quantity on the same 35-mL rotor at 12.5 mL/min of only 65 mg (122 mg at 5 mL/min time $F_{SU} = 0.56$). Following this prediction, 65 mg of the stock solution were injected on the 35-mL rotor at 2400 rpm and 12.5 mL/min flow rate producing the expected chromatogram with touching bands (Fig. 6A).

The maximal load on the 239-mL rotor at 35 mL/min can be calculated from any conditions tested on the 35-mL rotor provided that the “free-space between peaks” volume ΔV is measured on the 239-mL column. We chose to do the prediction with the 12.5 mL/min flow rate conditions listed in Table 2 for the small analytical 35-mL rotor with the measured ΔV value of 4.8 mL. Following the method, an analytical injection of the diluted solution on the 239-mL rotor at 1800 rpm and 35 mL/min returned a ΔV value of 56.6 mL which allows for the straightforward calculation of the scale-up factor $F_{SU} = 56.6/4.8 = 11.8$ (Table 2), a factor almost twice bigger than the simple column volume ratio. Multiplying this scale-up factor F_{SU} by the 65 mg maximal load on the 35-mL rotor allows to predict a 766 mg maximal load on the 239-mL rotor at 35 mL/min (Table 2). Fig. 6B chromatogram shows the touching band baseline separation of the injected 766 mg material. The two chromatograms on the two different size instruments are similar (Fig. 6). Table 2 summarizes the results obtained for both rotors at maximal productivities. It is pointed out that productivities were calculated only based on solute elution time. Two critical points

have to be considered. The first point is volumetric productivity that should consider the volume of solvent needed to perform the separation. Table 2 list the volume productivity as mg produced per mL and per hour for each configuration. It shows that the smaller 35-mL column has a better volumic productivity than the larger 239-mL column. This is related to the second point raised; the point concerned the delays needed for column reloads and re-equilibration between injections. The listed productivities would decrease as expected if delays induced by stationary phase loads and equilibration durations were incorporated. These delays are not indicated in our purifications because the end of the separation was certain after coumarin eluted allowing for another injection without refilling the column. In other purifications, it could be best to refill the column between each run, thus introducing delays that will reduce productivities.

The key point of this study is to demonstrate that the prediction of the maximal quantity that could be injected on rotors of different scales depends on the optimal operating conditions and that themselves depend on the production strategy. We developed an example on two different instruments: a small 35-mL one and a larger 239-mL instrument with two different objectives: (i) to purify a batch by loading the maximal possible mass of sample in one run with the largest possible “free-space between peaks”, ΔV , regardless of the duration of the purification or (ii) to optimize both the injected mass and the mobile phase flow rate so that several smaller injections can be done quickly, producing more purified material in less time, i.e. optimizing the productivity $\Delta V/t$ ratio.

In real cases, the optimal flow rate determination on the small rotor may not be needed because the aims of working on a small rotor are only method development and loading study. On the contrary, a large rotor must be used for increased productivity so it is best to work at the optimal flow rate. The determination of this optimal flow rate on the preparative instrument will require 4 or 5 analytical injections.

4. Conclusion

Fig. 7 gathers the essentials of the scaling-up method proposed for countercurrent chromatography instruments. Once the separation method is developed, a load optimization on a small and fast lab-scale rotor must be done. Next, the proposed “free-space between peaks” method requires only a single analytical injection on the large-scale production rotor to be able to predict the maximal productivity.

The method is only based on experimental observations; that is why it can be applied between any rotors or within a single rotor between operating conditions. If the transfer is possible at any operating conditions, provided that they give stable stationary phase retention and identical temperatures, it also indicates optimal operating conditions for batch or productivity strategies.

The method does have limitations:

- The stationary phase retention ratio, S_f , must be similar between analytical and loaded injections and should not change during runs.
- Resolution factors higher than 1 are required to have some space between peaks (positive ΔV).
- The method applies only to classical elution mode. Its uses in different modes such as the pH-zone refining mode or elution-extrusion have to be studied yet.

Acknowledgments

K.F. and A.B. thank the French Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, UMR 5280 ISA) for continuous support. E.B.

thanks the Kromaton Rousselet-Robatel Company and the French Association Nationale de la Recherche et de la Technologie for a three-year CIFRE PhD grant.

References

- [1] A. Berthod, Countercurrent chromatography: the support-free liquid stationary phase Comprehensive Analytical Chemistry, vol. 38, Elsevier, 2002.
- [2] W.D. Conway, Countercurrent Chromatography: Apparatus, Theory, and Applications, VCH, 1990.
- [3] Y. Ito, W.D. Conway, High-Speed Countercurrent Chromatography, Chemical Analysis, J. Wiley, 1996.
- [4] A. Berthod, T. Maryutina, B. Spivakov, O. Shpigun, I.A. Sutherland, Countercurrent chromatography in analytical chemistry (IUPAC Technical Report), Pure Appl. Chem. 81 (2009) 355–387.
- [5] M.C. Menet, D. Thiebaut, Preparative purification of antibiotics for comparing hydrostatic and hydrodynamic mode counter-current chromatography and preparative high-performance liquid chromatography, J. Chromatogr. A 831 (1999) 203–216.
- [6] K. Faure, N. Mekaoui, J. Meucci, A. Berthod, Solvent selection in countercurrent chromatography using small-volume hydrostatic columns, LC-GC North Am. 31 (2013) 132–143.
- [7] H. Luo, M. Peng, H. Ye, L. Chen, A. Peng, M. Tang, F. Zhang, J. Shi, Predictable and linear scale-up of four phenolic alkaloids separation from the roots of *Menispermum dauricum* using high-performance counter-current chromatography, J. Chromatogr. B 878 (2010) 1929–1933.
- [8] I.A. Sutherland, G. Audo, E. Bourton, F. Couillard, D. Fisher, I. Garrard, P. Hewitson, O. Intes, Rapid linear scale-up of a protein separation by centrifugal partition chromatography, J. Chromatogr. A 1190 (2008) 57–62.
- [9] J.B. Friesen, G.F. Pauli, GUESS—a generally useful estimate of solvent systems for CCC, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 28 (2005) 2777–2806.
- [10] J.B. Friesen, G.F. Pauli, Rational development of solvent system families in counter-current chromatography, J. Chromatogr. A 1151 (2007) 51–59.
- [11] J.B. Friesen, S. Ahmed, G.F. Pauli, Qualitative and quantitative evaluation of solvent systems for countercurrent separation, J. Chromatogr. A 1377 (2015) 55–63.
- [12] A. Berthod, M. Hassoun, M.J. Ruiz-Angel, Alkane effect in the Arizona liquid systems used in countercurrent chromatography, Anal. Bioanal. Chem. 383 (2005) 327–340.
- [13] L. Marchal, A. Foucault, G. Patissier, J.M. Rosant, J. Legrand, Influence of flow patterns on chromatographic efficiency in centrifugal partition chromatography, J. Chromatogr. A 869 (2000) 339–352.
- [14] L. Marchal, J. Legrand, A. Foucault, Mass transport and flow regimes in centrifugal partition chromatography, AIChE J. 48 (2002) 1692–1704.
- [15] D.W. Armstrong, G.L. Bertrand, A. Berthod, Study of the origin and mechanism of band broadening and pressure drop in centrifugal countercurrent chromatography, Anal. Chem. 60 (1988) 2513–2519.
- [16] E. Heftmann, Chromatography: Fundamentals and techniques, in: Chromatography: Fundamentals and Applications of Chromatography and Related Differential Migration Methods, Elsevier Scientific Publishing Company, 2004.
- [17] P. Gareil, R. Rosset, Analysis of the information in a preparative chromatogram for further optimization of the operating conditions, J. Chromatogr. 450 (1988) 13–25.
- [18] P. Gareil, C. Durieux, R. Rosset, Optimization of production rate and recovered amount in linear and nonlinear preparative elution liquid chromatography, Sep. Sci. Technol. 18 (1983) 441.
- [19] A. Berthod, D.W. Armstrong, Centrifugal partition chromatography. IV. Preparative sample purification and partition coefficient determination, J. Liq. Chromatogr. 11 (1988) 1187–1204.
- [20] L. Marchal, O. Intes, A. Foucault, J. Legrand, J.-M. Nuzillard, J.-H. Renault, Rational improvement of centrifugal partition chromatographic settings for the production of 5-n-alkylresorcinols from wheat bran lipid extract: I. Flooding conditions—optimizing the injection step, J. Chromatogr. A 1005 (2003) 51–62.
- [21] L. Chen, Q. Zhang, G. Yang, L. Fan, J. Tang, I. Garrard, S. Ignatova, D. Fisher, I.A. Sutherland, Rapid purification and scale-up of honokiol and magnolol using high-capacity high-speed counter-current chromatography, J. Chromatogr. A 1142 (2007) 115–122.
- [22] P. Wood, S. Ignatova, L. Janaway, D. Keay, D. Hawes, I. Garrard, I.A. Sutherland, Counter-current chromatography separation scaled up from an analytical column to a production column, J. Chromatogr. A 1151 (2007) 25–30.
- [23] H. Ye, L. Chen, Y. Li, A. Peng, A. Fu, H. Song, M. Tang, H. Luo, Y. Xu, J. Shi, Y. Wei, Preparative isolation and purification of three rotenoids and one isoflavone from the seeds of *Milletia pachycarpa* Benth by high-speed counter-current chromatography, J. Chromatogr. A 1178 (2008) 101–107.
- [24] S. Chollet, L. Marchal, J. Meucci, J.-H. Renault, J. Legrand, A. Foucault, Methodology for optimally sized centrifugal partition chromatography columns, J. Chromatogr. A 1388 (2015) 174–183.

4.1.3. Optimisation de la charge

4.1.3.1. Notion d'isotherme de distribution

La chromatographie de partage centrifuge étant une méthode préparative, la charge de l'échantillon sur la colonne est un point très important. En effet, à pureté donnée, plus la charge d'échantillon sur la colonne est importante, plus grande sera la productivité (20).

En chromatographie préparative sur phase solide, l'équilibre d'adsorption d'un composé est défini par des isothermes, qui corrélient la charge q_i du soluté sur la phase stationnaire (l'adsorbant) en fonction de la concentration C_i du soluté dans la phase mobile, et ceci à température donnée (21).

L'influence de l'évolution de l'isotherme d'adsorption sur la forme d'un pic chromatographique est illustrée Figure 37. Son observation montre que tant que l'isotherme d'adsorption est linéaire, le pic chromatographique est symétrique. Dès lors que la courbe devient convexe ou concave, une déformation du pic apparaît, avec une trainée de pic vers l'arrière quand le cas d'une courbe convexe et une trainée vers l'avant du pic lorsque la courbe est concave (22).

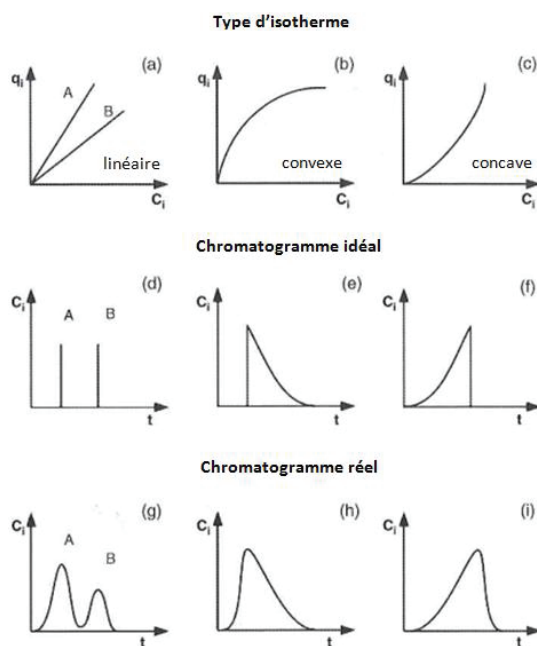


Figure 37 : Influence du type d'isotherme d'équilibre sur le chromatogramme (21).

Une analogie peut être effectuée avec la chromatographie liquide-liquide. Dans ce dernier cas, la phase stationnaire étant liquide, on ne trace plus la charge du composé q_i sur la phase stationnaire en fonction de la concentration C_i de ce même composé dans la phase mobile mais la concentration du composé dans la phase stationnaire C_{Si} en fonction de la concentration du composé dans la phase mobile C_{Mi} à température donnée. A noter qu'une courbe convexe dans le cas d'une utilisation d'un système solvant en mode ascendant deviendra concave lors de son utilisation dans le mode contraire (22).

Dans le cas du tracé de l'isotherme de partition d'un composé en chromatographie liquide-liquide, la pente de la droite est égale au coefficient de partage K_d . Comme pour la Figure 37, les isothermes sont dans un premier temps linéaires, mais ils peuvent évoluer vers des courbes convexes ou concaves. Ceci nous permet de remarquer un point important : le coefficient de partage est bien une constante, mais seulement dans le cas de solutions diluées (18, 22). En effet, dès lors que la concentration en soluté augmente de manière trop importante, la saturation de l'une ou de l'autre phase peut apparaître : l'isotherme n'est alors plus linéaire, modifiant ainsi la valeur du coefficient de partage. La chromatographie liquide-liquide comportant un système phase stationnaire-phase mobile composé de deux liquides, il est à supposer que l'isotherme reste cependant beaucoup plus longtemps linéaire, une phase stationnaire liquide absorbant les solutés étant beaucoup plus difficile à saturer qu'une phase stationnaire solide où cette fois-ci les solutés sont adsorbés. La Figure 38 montre les isothermes de partition de trois composés : l'hydroquinone, le pyrocatechol et le phénol, dans un système solvant composé de n-hexane/acétate d'éthyle/éthanol/eau en proportions 1/1/1/1 (v/v). Ici, les isothermes sont bien linéaires sur une première zone (en orange) puis commencent à devenir convexes, induisant une diminution du coefficient de partage (23).

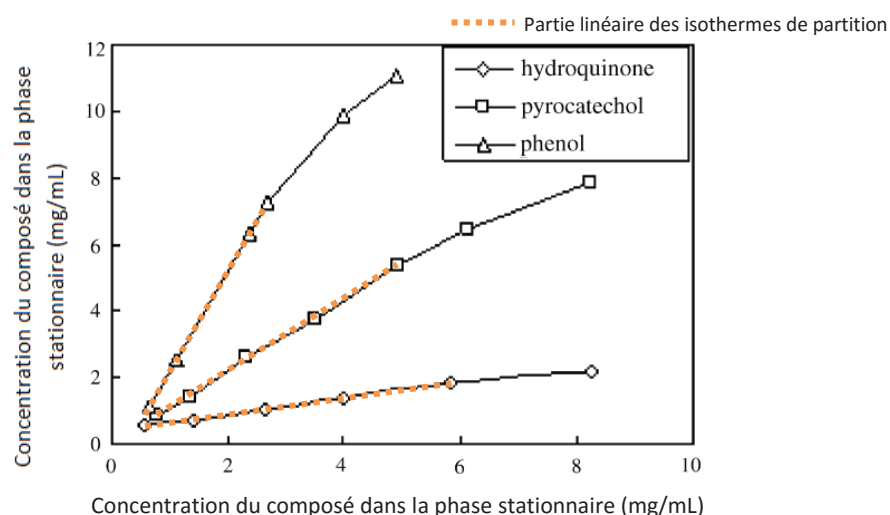


Figure 38 : Isothermes de partition de trois composés (hydroquinone, pyrocatechol et phénol) séparés à l'aide d'un système solvant n-hexane/acétate d'éthyle/éthanol/eau 1/1/1/1 (v/v) sur un système hydrodynamique Tauto Biotech 1000A (volume colonne = 1L) (23). Les parties linéaires ont été mises en évidence en pointillés orange.

4.1.3.2. Etude de la charge en CPC

L'augmentation de la charge sur une colonne peut être effectuée soit en concentration, soit en volume, soit de manière mixte (en concentration et en volume). En chromatographie liquide sur phase solide, une augmentation du volume d'injection aura pour effet un élargissement des pics vers de fortes rétentions (24, 25). Ce phénomène peut également être observé lors de l'augmentation du volume d'injection d'échantillons en CPC, comme ceci est le cas lors de l'injection d'un mélange new coccine red (r) et aspirine (A), dont les coefficients de partage sont inférieurs à 1 (Figure 39). Le new coccine red et l'aspirine subissent ici un temps d'injection de plus en plus long, induisant une traînée de pic chromatographique de plus en plus importante. En revanche, ce phénomène n'est pas constaté sur le pic de Coumarine (M) dont le coefficient de partage est supérieur à 1. Ceci pourrait être dû à un phénomène

de concentration en tête de colonne, dû à la plus forte affinité du soluté pour la phase stationnaire, qui pallierait à la durée importante de l'injection.

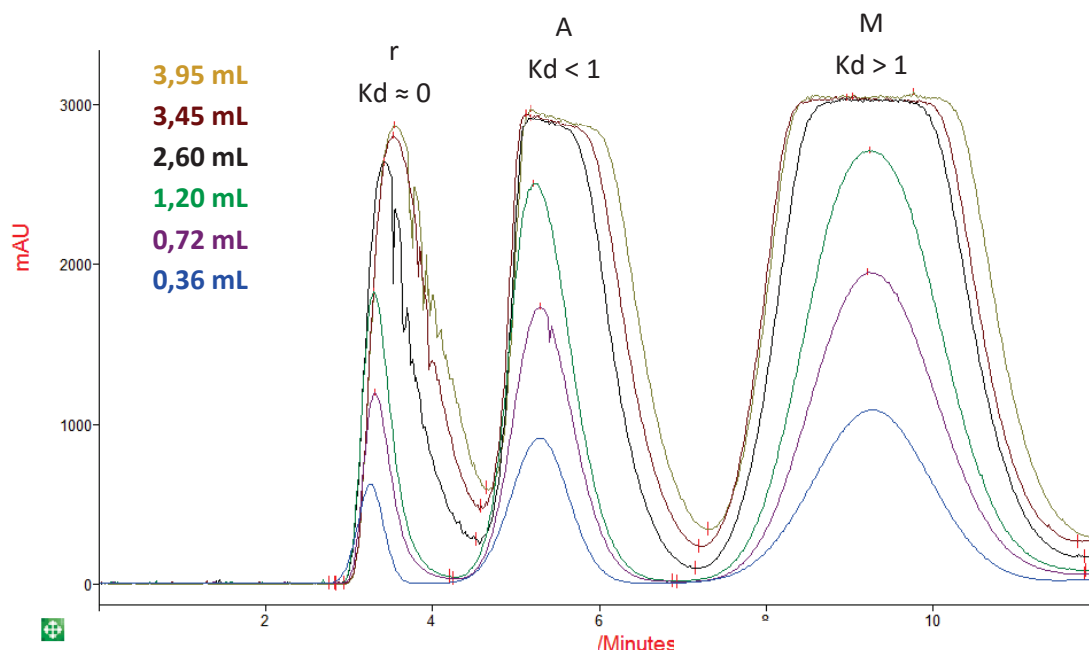


Figure 39 : Injections chargées de la solution mère diluée par 2 (new coccine red à 1 mg/mL, aspirine à 30 mg/mL et coumarine à 13 mg/mL) à différents volumes d'injection. Rotor 35 mL, 1800 rpm, 5 mL/min, mode descendant, $S_f = 54\%$, $P = 43$ bar, détection UV $\lambda = 254$ nm.

Dans le cas de l'augmentation de la concentration en chromatographie sur phase solide, un élargissement dissymétrique des pics vers les faibles rétentions est observé, dû la saturation de la phase stationnaire en tête de colonne (25). L'isotherme d'adsorption n'est alors plus linéaire. En CPC, il existe bien une possibilité de saturation de la phase stationnaire. Cependant, ce phénomène ne se traduit pas par une déformation et une trainée de pics tels qu'illustrés sur la Figure 37, mais plutôt par une perte de phase stationnaire et dès lors, une augmentation du bruit sur le chromatogramme. Ceci serait dû aux modifications des propriétés physico-chimiques de la phase saturée (densité plus importante, viscosité, etc.) conduisant à un déséquilibre de la colonne.

Ce propos peut être illustré dans le cas de l'injection de 1,4 mL d'un mélange concentré de new coccine red, aspirine et coumarine. En effet, lorsque la solution mère diluée par 2 (43,5 mg/mL) est injectée à 1800 rpm et 5 mL/min, les pics restent approximativement symétriques alors que lorsque le même volume est injecté à une concentration de 87 mg/mL (solution mère pure), une apparition de bruit est observée lors de la sortie du pic du new coccine red correspondant à une perte non négligeable de phase stationnaire (≈ 2 mL soit 11 % de la phase stationnaire contenue dans la colonne après équilibrage) (Figure 40).

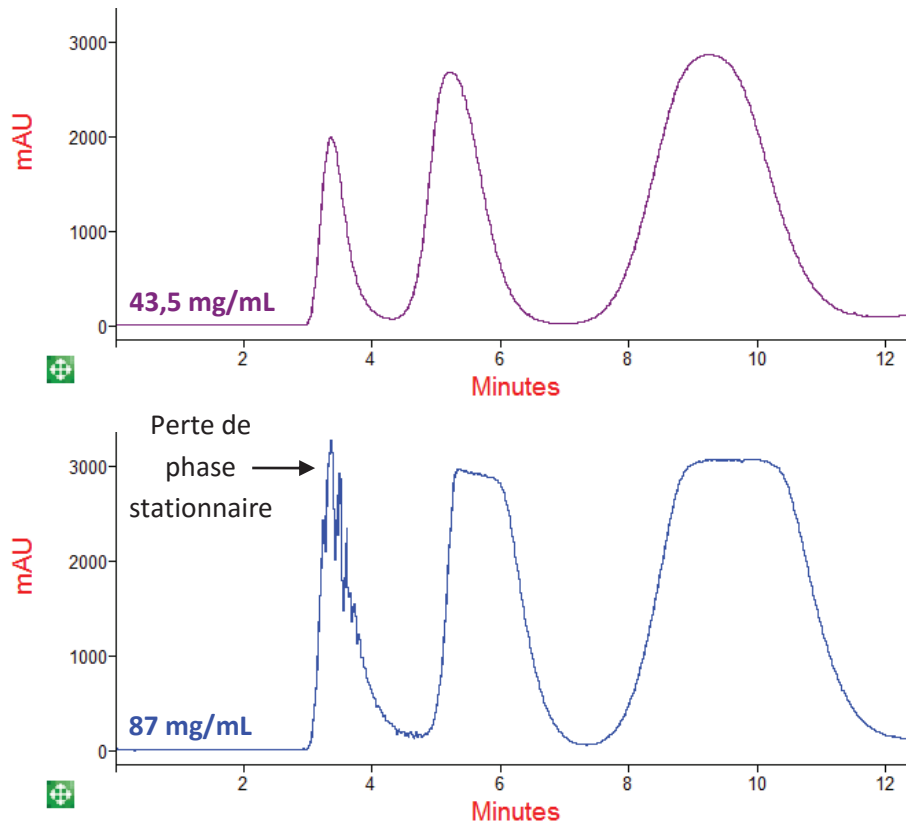


Figure 40 : Injections chargées de 1,4 mL de la solution mère diluée par 2 ou pure (new coccone red, aspirine et coumarine à 43,5 mg/mL et 87 mg/mL). Rotor 35 mL, 1800 rpm, 5 mL/min, mode descendant, Sf à l'injection = 54 %, $P = 47$ bar, détection UV $\lambda = 254$ nm.

En injectant les solutés séparément (Figure 41), on se rend compte que ce phénomène de perte de phase stationnaire est dû à la surcharge en aspirine, dont le coefficient de partage est inférieur à 1.

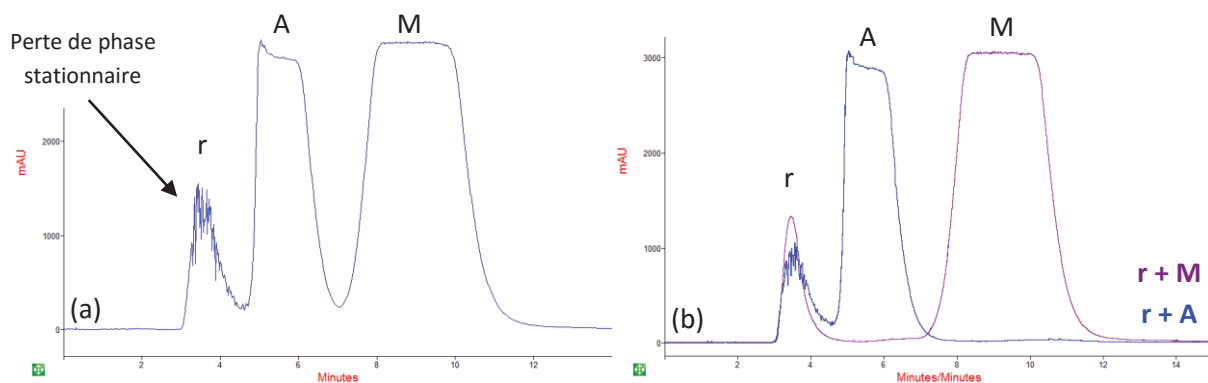


Figure 41 : (a) Injection chargée de 2,2 mL de la solution mère contenant les 3 composés. (b) Injections chargées de 2,2 mL des composés deux à deux ($r + A$ et $r + M$) aux mêmes concentrations que dans la solution mère. $K_{d_r} = 0$; $K_{d_A} = 0,6$; $K_{d_M} = 1,6$. $[r] = 2$ mg/mL, $[A] = 60$ mg/mL et $[M] = 25$ mg/mL. Rotor 35 mL, 1800 rpm, 5 mL/min, mode descendant, Sf à l'injection = 54 %, $P = 47$ bar, $\lambda = 254$ nm.

Lors de l'introduction de l'échantillon, les solutés se partagent entre les phases suivant leur affinité. Les composés dont le coefficient de partage est inférieur à 1 resteront préférentiellement dans la phase mobile tandis que les autres (coefficient de partage supérieur à 1) seront dilués dans la phase stationnaire. Si la concentration en composés dont le K_d est inférieur à 1 est trop importante, les solutés resteront en

priorité en phase mobile, modifiant alors parfois de manière non négligeable la densité de la phase et donc l'équilibre entre les phases (17). De ceci peut résulter une perte de phase stationnaire due au déséquilibre de la colonne.

Une manière de remédier à ce problème peut être d'augmenter la vitesse de rotation de la colonne. En effet, ceci aura pour effet d'améliorer les échanges entre les phases puisque plus la force centrifuge du rotor est importante, plus de fines gouttelettes de phase mobile se formeront au sein de la phase stationnaire (17, 18). En réalisant l'injection de la même quantité de new coccine red, aspirine et coumarine à 2400 rpm au lieu de 1800 rpm, le phénomène de perte de phase stationnaire disparaît complètement.

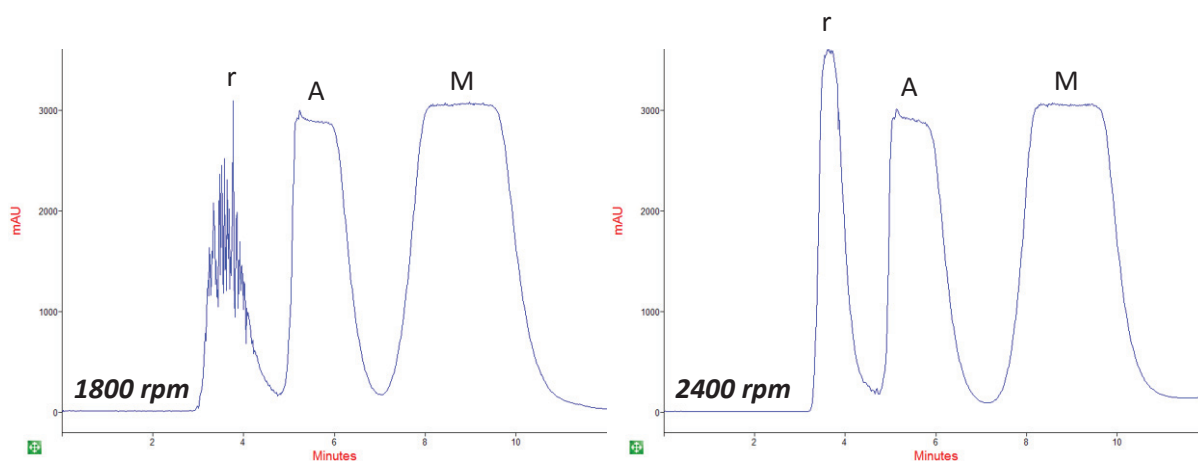


Figure 42 : Injections chargées de 2,2 mL de la solution mère (new coccine red (r) à 2 mg/mL, aspirine (A) à 60 mg/mL et coumarine (M) à 25 mg/mL) à 1800 rpm (à gauche) et 2400 rpm (à droite). $K_{d_r} = 0$; $K_{d_A} = 0,6$; $K_{d_M} = 1,6$. Rotor 35 mL, 5 mL/min, mode descendant, Sf à l'injection = 47 %, $P = 64$ bar, $\lambda = 254$ nm.

Il apparaît donc qu'en CPC, s'il y a une surcharge en concentration, une perte de phase stationnaire peut être observée. Tant que cette perte n'apparaît pas, l'isotherme de partition du soluté reste linéaire, à partir du moment où la force centrifuge est assez importante pour favoriser un échange maximal entre les phases.

La surcharge mixte consiste à charger une colonne en concentration et en volume. Il apparaît qu'en chromatographie sur phase solide, il est préférable de charger une colonne d'abord en concentration puis en volume, afin de pouvoir charger plus d'échantillon (26). En effet, l'élargissement des pics est plus conséquent en volume qu'en concentration. En CPC, comme l'élargissement de pics n'apparaît qu'avec la charge en volume, l'utilisateur a tout intérêt à charger également d'abord en concentration jusqu'à une limite inférieure à la perte de phase stationnaire puis en volume afin de continuer à augmenter la quantité injectée.

4.1.4. Transfert sur prototype 88 mL

Un scale-up de la méthode de purification est à présent effectué sur le rotor prototype 88 mL afin de valider la méthodologie sur un rotor dont le nombre de cellules, le design et le volume est différent du rotor 254 mL. Le scale-up est réalisé à partir de la même méthode développée initialement sur le rotor 35 mL (§ 4.1.1). Comme nous avons pu le voir dans la publication (27), il est possible de travailler à deux débits différents selon si l'utilisateur souhaite œuvrer en mode injection unitaire (une seule injection chargée) ou en mode productivité (injections répétées). En réalisant quelques injections analytiques, les conditions opératoires optimales sont déterminées sur le rotor 88 mL. Le transfert est ensuite effectué selon les objectifs choisis (injection unitaire ou productivité).

4.1.4.1. Détermination des conditions opératoires optimales sur le prototype 88 mL

Afin de visualiser l'évolution de l'espace disponible en fonction de la force centrifuge, des injections analytiques sont réalisées à différentes vitesses de rotations (de 1500 à 3000 rpm).

Comme dans le cas du rotor 254 mL, l'espace disponible ΔV entre les pics d'aspirine et de coumarine augmente avec la vitesse de rotation (Figure 43). Le taux de phase stationnaire étant constant avec la variation de la vitesse de rotation (environ 50% sur la gamme étudiée), l'augmentation du ΔV est probablement due à l'amélioration de l'efficacité (17, 18, 28). Ainsi, la plus grande valeur de ΔV est atteinte à 3000 rpm. Au vue de la faible pression engendrée par le rotor 88 mL (< 50 bar), il est donc tout à fait possible de travailler à 3000 rpm. Cependant, une vitesse de rotation élevée peut accélérer les échauffements au sein des joints rotatifs du rotor, augmentant ainsi la température du système et les manipulations non répétables. Le choix s'est donc porté vers une vitesse de rotation légèrement plus faible de 2500 rpm, permettant de garder une efficacité et un ΔV très convenables.

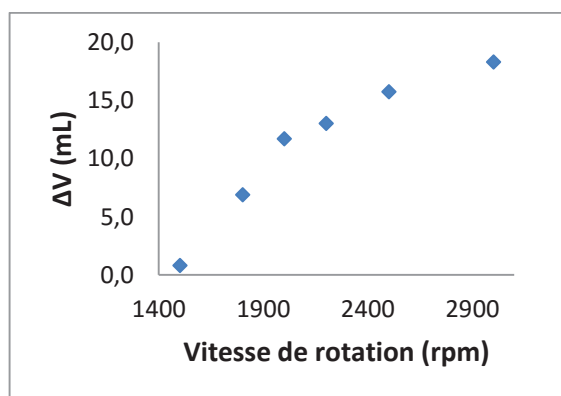


Figure 43 : Valeur du ΔV entre les pics d'aspirine et de coumarine en fonction de la vitesse de rotation en rpm à 15 mL/min sur le rotor 88 mL. Injections analytiques : solution mère de new coccine red, aspirine et coumarine diluée par 7,5 et volume d'injection = 1% du volume colonne.

4.1.4.2. Evolution du ΔV en fonction du débit

Le choix de la vitesse de rotation ayant été fait, plusieurs injections analytiques sont réalisées en faisant varier le débit afin d'observer dans un premier temps le taux de phase stationnaire (Figure 44a) mais aussi l'espace disponible ΔV entre les pics d'aspirine et de coumarine pour la détermination des conditions permettant une charge maximale sur une opération (Figure 44b). Le rapport $\Delta V/t$ est également tracé afin de déterminer à quel débit il est intéressant de travailler pour avoir une productivité maximale (Figure 44c).

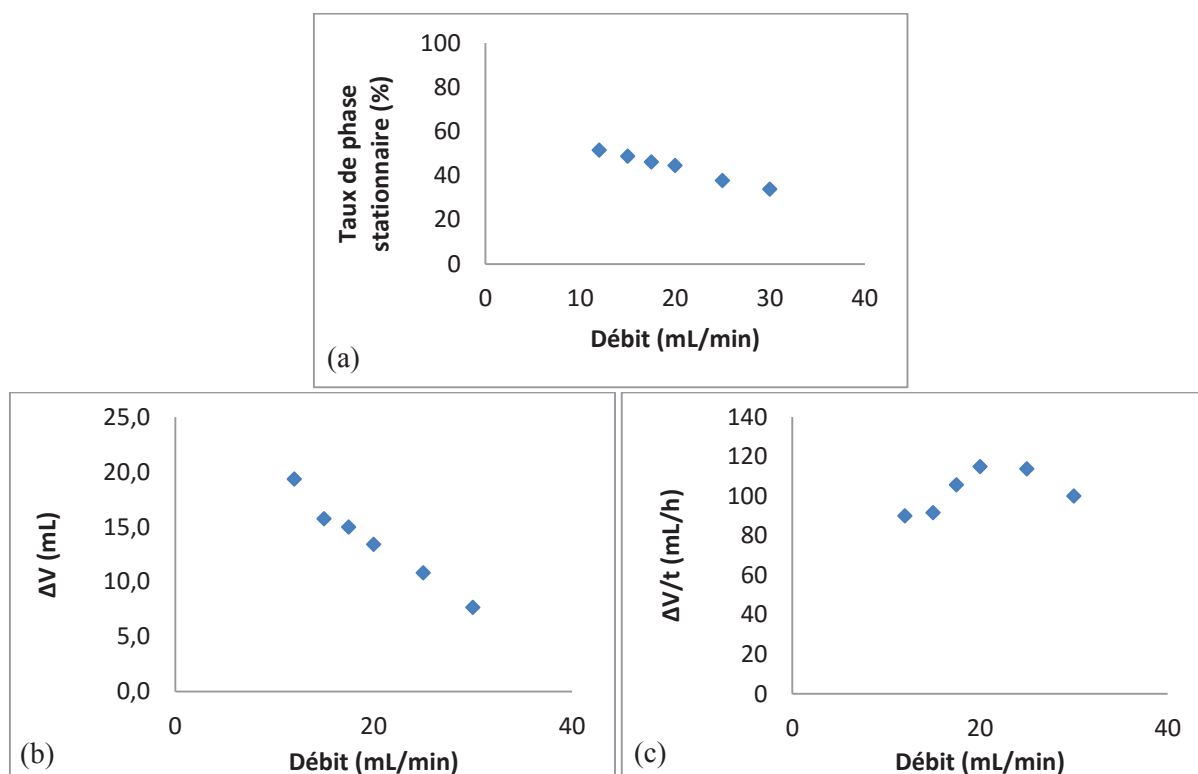


Figure 44 : (a) Variation du taux de phase stationnaire, (b) valeur du ΔV et (c) valeur du $\Delta V/t$ entre les pics d'aspirine et de coumarine, en fonction du débit en mL/min. Rotor 88 mL, vitesse de rotation = 2500 rpm, injections analytiques : solution mère de new coccine red, aspirine et coumarine diluée par 7,5 et volume d'injection = 1% du volume colonne.

Les mesures du taux de phase stationnaire en fonction du débit montrent que l'augmentation de ce dernier a pour conséquence une diminution de phase stationnaire, entraînée de plus en plus fortement par la phase mobile (Figure 44a).

L'observation du ΔV en fonction du débit montre sa diminution avec l'augmentation du débit (Figure 44b). Ceci est principalement dû à la perte de phase stationnaire engendrée par l'augmentation du débit puisque l'efficacité est quant à elle plutôt meilleure à fort débit (17). Le ΔV maximal est observé au débit minimal testé soit 12 mL/min. Sa valeur est de 19,3 mL. On note ici que des débits plus faibles entraîneraient probablement des valeurs de ΔV plus grandes. Cependant, afin d'éviter de réaliser des manipulations trop longues, ces derniers ne seront pas testés.

Le tracé du $\Delta V/t$ sur le rotor 88 mL (Figure 44c) montre qu'il existe comme dans le cas du rotor 254 mL un optimum, au-delà duquel la perte de phase stationnaire devient tellement importante que la

productivité se met à diminuer. Cet optimum est observé pour un débit de 20 mL/min. A ce débit, la valeur du ΔV est égale à 13,4 mL. Le Tableau 20 récapitule les différentes valeurs des ΔV entre les pics d'aspirine et de coumarine à ΔV_{\max} et $\Delta V/t_{\max}$ à 2500 rpm.

Tableau 20 : Valeurs des ΔV entre les pics d'aspirine et de coumarine à ΔV_{\max} et $\Delta V/t_{\max}$ sur le rotor 88 mL utilisé en système solvant Arizona M à 2500 rpm.

Objectif	Critère	Débit	Valeur du ΔV
Opération	ΔV_{\max}	12 mL/min	19,3 mL
Productivité	$\Delta V/t_{\max}$	20 mL/min	13,4 mL

4.1.4.3. Transfert de la méthode depuis le rotor 35 mL vers le prototype 88 mL

La méthode développée sur petit rotor 35 mL et à transférer est récapitulée Tableau 21.

Tableau 21 : Méthode développée sur petit rotor à 2400 rpm, 5 mL/min, à transférer sur le prototype 88 mL.

	Petit rotor
Volume	35 mL
Vitesse de rotation	2400 rpm
Débit $F_{35\text{mL}}$	5 mL/min
Valeur du ΔV obtenue sur injection analytique	8,6 mL
Composés/concentrations	[r] 2,0 mg/mL [A] 60,0 mg/mL [M] 25,0 mg/mL
Volume injection	1,4 mL
Quantité injectée $Q_{\max.\text{inj.}35\text{mL}}$	122 mg
Durée d'élution	11,3 min
Productivité horaire	648 mg/h

Si l'objectif est de produire un maximum par opération, le prototype 88 mL doit être utilisé à 2500 rpm, 12 mL/min (Tableau 20). Le facteur de scale-up entre les deux rotors est alors de 2,2 et la quantité à injecter de 268 mg. La réalisation de l'injection de 268 mg d'échantillon (= 3,1 mL) donne un profil chromatographique très similaire à l'injection chargée réalisée sur le rotor 35 mL à 5 mL/min (Figure 45). Le fait d'avoir une vallée plus haute en intensité entre les pics de new coccine red et d'aspirine ne signifie pas que la pureté est moins bonne, mais est dû à une très légère perte de phase stationnaire au moment de la sortie du pic de new coccine red qui élève l'intensité du signal. Une saturation est observée au sein des pics du chromatogramme issu de la purification sur le rotor 88 mL alors qu'elle n'est pas visible sur le chromatogramme effectué sur le rotor 35 mL. Ceci est dû à l'utilisation d'un détecteur différent entre les deux essais.

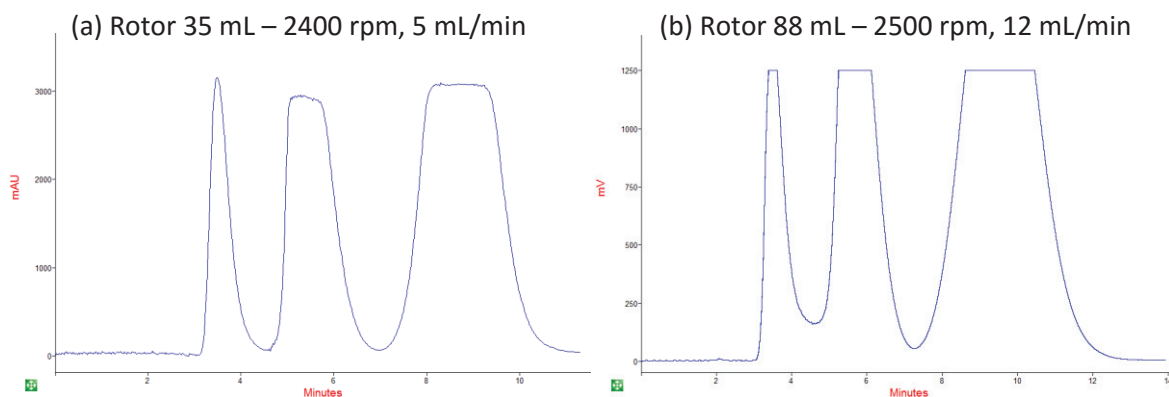


Figure 45 : Injections préparatives de la solution mère, mode descendant. (a) Rotor 35 mL, $V_{inj} = 1,4$ mL, 2400 rpm, 5 mL/min, $Sf = 50$ %, $P = 54$ bar, durée d'élution = 11,3 minutes, $\lambda = 254$ nm. (b) Rotor 88 mL, $V_{inj} = 3,1$ mL, 2500 rpm, 12 mL/min, $Sf = 52$ %, $P = 37$ bar, durée d'élution = 13 minutes, détecteur UV Shimadzu $\lambda = 254$ nm.

Si l'objectif est d'avoir le meilleur rendement horaire (productivité), le prototype 88 mL doit être utilisé à 2500 rpm, 20 mL/min (Tableau 20). Le facteur de scale-up entre les deux rotors est alors de 3,0 et la quantité à injecter est de 195 mg. Une injection de 195 mg d'échantillon Guess (= 2,2 mL) est donc réalisée à 2500 rpm et 20 mL/min (Figure 46).

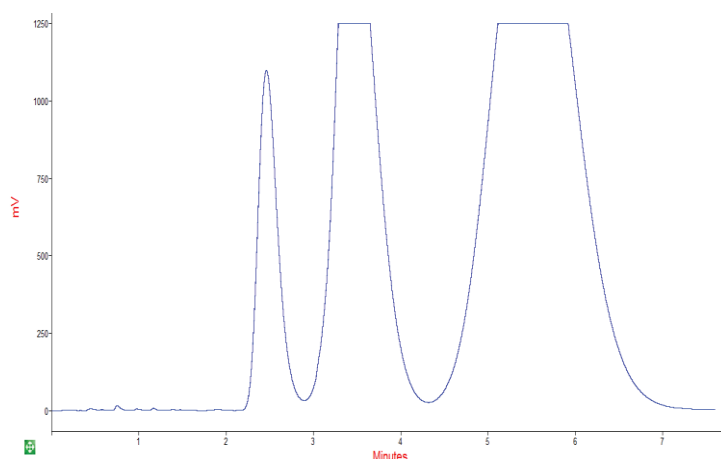


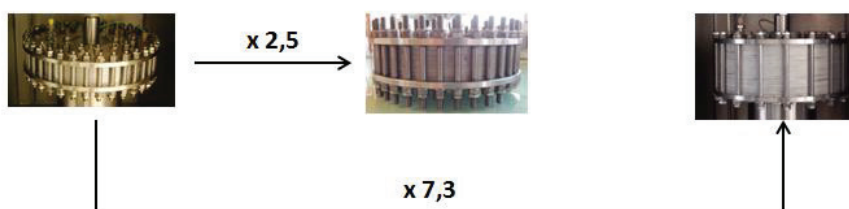
Figure 46 : Injection préparative de la solution mère (new coccine red $[r] = 2$ mg/mL, aspirine $[A] = 60$ mg/mL et coumarine $[M] = 25$ mg/mL), mode descendant. Rotor 88 mL, $V_{inj} = 2,2$ mL, 2500 rpm, 20 mL/min, $Sf = 45$ %, $P = 36$ bar, durée d'élution = 7,3 minutes, détecteur UV Shimadzu $\lambda = 254$ nm.

Dans ces conditions, la productivité est de 1603 mg/h soit 1,8 fois plus importante que le rotor 35 mL utilisé à 12,5 mL/min. On remarque cependant que la productivité du rotor 88 mL est moins élevée que le ratio des volumes colonne, d'une valeur de 2,5. Ceci est probablement dû à un plus faible nombre de cellules dans le cas du rotor 88 mL (406 cellules contre 832 cellules sur le rotor 35 mL) induisant une plus faible efficacité du rotor.

Le Tableau 22 permet de comparer les conditions opératoires, les quantités injectées et productivités pour la séparation des trois composés Guess new coccine red, aspirine et coumarine pour les trois rotors testés : 35 mL, 88 mL et 254 mL.

Tableau 22 : Comparaison des performances de 3 rotors Kromaton lors de la séparation de trois composés
Guess : new coccine red, aspirine et coumarine.

	Echelle laboratoire $V_{\text{colonne}} = 35 \text{ mL}$ $n_{\text{cellules}} = 832$		Echelle mini-préparative $V_{\text{colonne}} = 88 \text{ mL}$ $n_{\text{cellules}} = 406$		Echelle semi-préparative $V_{\text{colonne}} = 254 \text{ mL}$ $n_{\text{cellules}} = 840$	
	Opération unitaire ΔV_{max}	Productivité $\Delta V/t_{\text{max}}$	Opération unitaire ΔV_{max}	Productivité $\Delta V/t_{\text{max}}$	Opération unitaire ΔV_{max}	Productivité $\Delta V/t_{\text{max}}$
Débit	5 mL/min	12,5 mL/min	12 mL/min	20 mL/min	15 mL/min	35 mL/min
Vitesse de rotation <i>Force centrifuge</i>	2400 rpm 648 g		2500 rpm 703 g		1800 rpm 365 g	
Taux de phase stationnaire	50 %	28 %	52 %	45 %	52 %	42 %
Pression	54 bar	54 bar	37 bar	36 bar	54 bar	52 bar
Volume injecté	1,4 mL	0,75 mL	3,2	2,2 mL	11,0 mL	8,8 mL
Durée d'élution	11,3 min 0,19 h	4,5 min 0,08 h	13,0 min 0,22 h	7,3 min 0,12 h	27,4 min 0,46 h	10,1 min 0,17 h
Masse d'échantillon injectée	122 mg	65 mg	268 mg	195 mg	957 mg	766 mg
Quantité d'échantillon traitée/h	648 mg/h	867 mg/h	1237 mg/h	1603 mg/h	2095 mg/h	4550 mg/h
Consommation solvants/opération	57 mL	56 mL	156 mL	146 mL	411 mL	354 mL
Consommation solvants/h	0,3 L/h	0,7 L/h	0,7 L/h	1,2 L	0,9 L/h	2,1 L/h



En mode production par opération (ΔV_{max}), la masse d'échantillon injectée par opération est 2,1 fois plus importante sur le rotor 88 mL (268 mg) et 7,8 fois plus importante sur le rotor 254 mL (957 mg) que sur le rotor analytique (122 mg). Les quantités maximales injectées par opération sont finalement presque équivalentes au rapport des volumes colonne mais les légères variations ont pu être anticipées avec l'application de notre méthodologie.

En termes de productivité, la quantité d'échantillon traitée par heure est 1,8 fois plus importante entre le rotor 35 mL et le rotor 88 mL (867 mg d'échantillon traité/h sur le rotor 35 mL contre 1603 mg d'échantillon traité/h sur le rotor 88 mL). Entre les rotors 35 mL et 254 mL, la productivité est améliorée de 5,2 fois (867 mg d'échantillon traité/h sur le rotor 35 mL contre 4550 mg d'échantillon traité/h sur le

rotor 254 mL). Même si l'augmentation de la productivité est plus faible que le rapport des volumes colonne, il a été possible de prédire les quantités maximales injectables sur chaque rotor. Les conditions opératoires ont pu être choisies en fonction de l'objectif de production et plus particulièrement à débit tel que la productivité est à son maximum pour chaque rotor.

L'utilisation de solutés Guess a permis ici de valider la méthodologie de scale-up mise en place au sein du laboratoire et ceci sur deux rotors de différents volumes et de cellules dont le nombre et le design ont varié entre chaque changement d'échelle. Les solutés Guess ne sont cependant pas représentatifs d'un échantillon réel. Il conviendra donc pour la suite de vérifier le fonctionnement de la méthodologie sur un échantillon concret.

5. Transfert appliqué à un échantillon réel : le romarin

Dans la section précédente, nous avons pu mettre en place une méthodologie de changement d'échelle indépendante du rapport des volumes colonnes et des conditions opératoires. L'utilisateur peut ainsi utiliser cette méthodologie sans contrainte instrumentale puisqu'il peut choisir les conditions opératoires en fonction des possibilités de sa machine mais aussi en fonction de son objectif de production.

Le fonctionnement de la méthodologie ayant été montré sur la séparation de trois solutés tests (new coccine red, aspirine et coumarine), nous avons décidé de mettre en œuvre ici un changement d'échelle appliqué à un échantillon réel, la purification du carnosol provenant d'un extrait de romarin, dont nous avons développé la méthode sur petit rotor 35 mL au cours du chapitre 2. Cet échantillon composé d'un très grand nombre de molécules différentes puisqu'il est issu d'une matrice végétale, permettra de tester la méthodologie dans des conditions plus complexes. Le scale-up sera dans un premier temps effectué sur le rotor semi-préparatif de 254 mL puis des essais seront réalisés afin de transférer la méthode sur un rotor préparatif de 812 mL dans le but d'augmenter la production de manière significative.

5.1. Optimisation de la production sur rotor analytique 35 mL

La méthode de purification du carnosol provenant d'un extrait de romarin a été développée d'un point de vue chimique (choix du système solvant et de sa composition) au cours du chapitre 2. Elle consiste à injecter et réaliser la séparation des composants d'un extrait éthanolique sec de romarin afin d'en isoler la molécule de carnosol. Ceci est réalisé à l'aide du système solvant heptane/MTBE/éthanol/eau en proportions 4/1/4/1 (v/v), utilisé en mode ascendant.

Lors de la présentation de la méthodologie de scale-up, nous avons pu mettre en évidence un point très important en chromatographie préparative : l'optimisation des conditions opératoires en fonction de l'objectif de production. Même si cela n'est pas fondamentalement nécessaire puisqu'il n'est pas destiné à la production, nous avons cherché à optimiser le procédé sur rotor analytique afin de pouvoir comparer ses qualités de charge et de productivité avec les rotors de taille semi-préparative (254 mL) et pilote (812 mL).

5.1.1.1. Conditions opératoires optimales

La détermination des conditions opératoires optimales est réalisée en 5 injections à 5 débits successifs, de 5 à 15 mL/min. La vitesse de rotation est gardée constante à 2200 rpm car elle est considérée comme la vitesse de rotation maximale, permettant une bonne rétention de phase stationnaire (54% à 5 mL/min) sans engendrer une pression trop élevée ($P = 47$ bar à l'injection). Pour cela, 0,5 mL d'échantillon sont injectés ($\approx 1\%$ du volume colonne). Le ΔV et le $\Delta V/t$ entre le pic de carnosol et l'impureté le précédant sont calculés pour chaque débit (Figure 47). Pour le calcul du $\Delta V/t$, t correspond ici au temps d'élution de la colonne, auquel s'ajoutent les temps d'équilibration et d'extrusion.

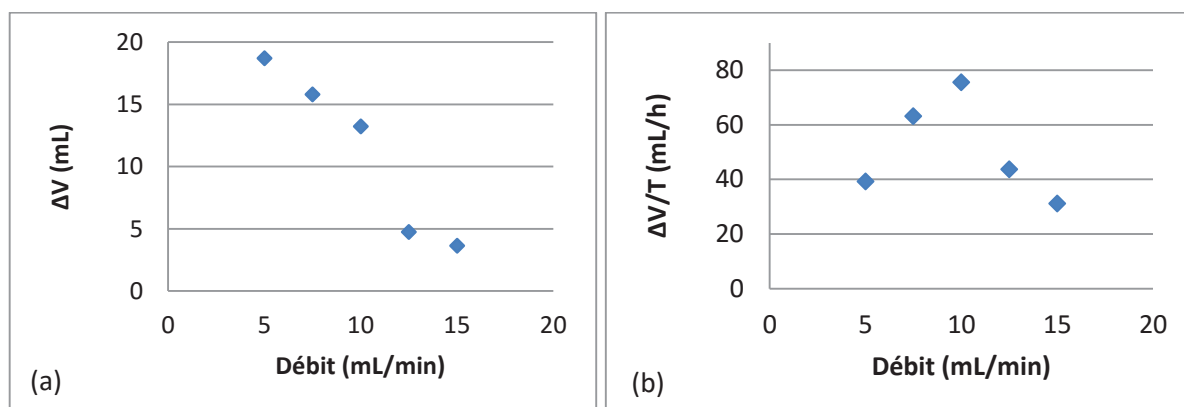


Figure 47 : Evolution (a) du ΔV et (b) du $\Delta V/t$ entre les pics de carnosol et l'impureté précédente en fonction du débit sur le rotor analytique 35 mL à 2200 rpm.

L'observation de la Figure 47 montre qu'un débit de 5 mL/min permet d'obtenir un espace disponible ΔV le plus grand dans la gamme de débits testés (chromatogramme présenté Figure 48). La meilleure productivité est quant à elle obtenue à 10 mL/min puisque c'est à ce débit que le $\Delta V/t$ est maximal. La détermination de la charge maximale sera donc effectuée à ces deux débits, dont les valeurs des ΔV sont regroupées dans le Tableau 23.

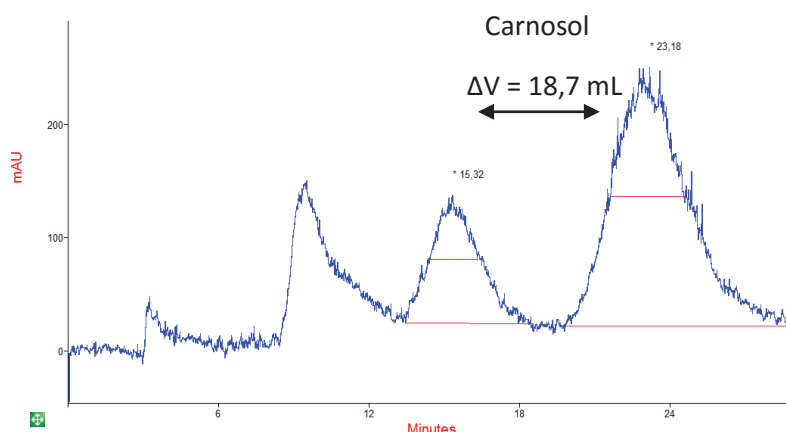


Figure 48 : Injection analytique de l'extrait de romarin. Système solvant heptane/MTBE/éthanol/eau 4/1/4/1 (v/v) utilisé en mode ascendant. Rotor analytique 35 mL, 2200 rpm, 5 mL/min, $V_{inj} = 0,5$ mL, $S_f = 54$ %, $P = 48$ bar. Détection UV $\lambda = 210$ nm.

Tableau 23 : Valeurs des ΔV entre les pics de carnosol et l'impureté précédente à ΔV_{max} et $\Delta V/t_{max}$ sur le rotor 35 mL utilisé en système solvant heptane/MTBE/éthanol/eau 4/1/4/1 (v/v) à 2200 rpm.

Objectif	Critère	Débit	Valeur du ΔV
Opération	ΔV_{max}	5 mL/min	18,7 mL
Productivité	$\Delta V/t_{max}$	10 mL/min	13,2 mL

5.1.1.2. Etude de la charge maximale

L'étude de la quantité maximale injectable sur le petit rotor analytique 35 mL est réalisée dans un premier temps à 5 mL/min. Les critères fixés pour l'étude de la charge est un retour à la ligne de base entre les pics de carnosol et les impuretés environnantes, permettant une pureté du carnosol avoisinant les 100%. Le pic le plus proche est situé en amont du pic de carnosol, c'est ce dernier qui sera surveillé en priorité. L'étude de la charge est effectuée sur 4 injections de 1,0 mL à 2,5 mL (Figure 49). Les injections à 1,0 et 1,5 mL montrent un retour à la ligne de base correct, tandis que sur les deux injections plus chargées (2,0 et 2,5 mL), le retour à la ligne de base ne semble pas respecté.

On remarque sur les chromatogrammes de la Figure 49 que plus la quantité d'échantillon injectée est importante, plus il y a perte de phase stationnaire. En effet, les pics sortants au temps mort (entre 3,5 et 4,3 minutes) sortent plus tard, traduisant un volume mort plus important et donc un taux de phase stationnaire plus faible. De même, le temps de rétention du carnosol apparaît de plus en plus court avec l'augmentation du volume d'injection. Cette diminution du temps de rétention sur les composés dont le coefficient de partage est supérieur à 1 est caractéristique d'une diminution du taux de phase stationnaire. La perte de phase stationnaire observée est probablement due à l'introduction de l'échantillon en phase stationnaire, induisant un léger déséquilibre au sein de la colonne.

Le but étant de charger la colonne au maximum, une injection de 1,5 mL est préférée, correspondant à une quantité d'échantillon à injecter de 272 mg (1 mL d'échantillon comporte 181 mg de romarin dissous). La perte de phase stationnaire lors de cette injection apparaît nulle.

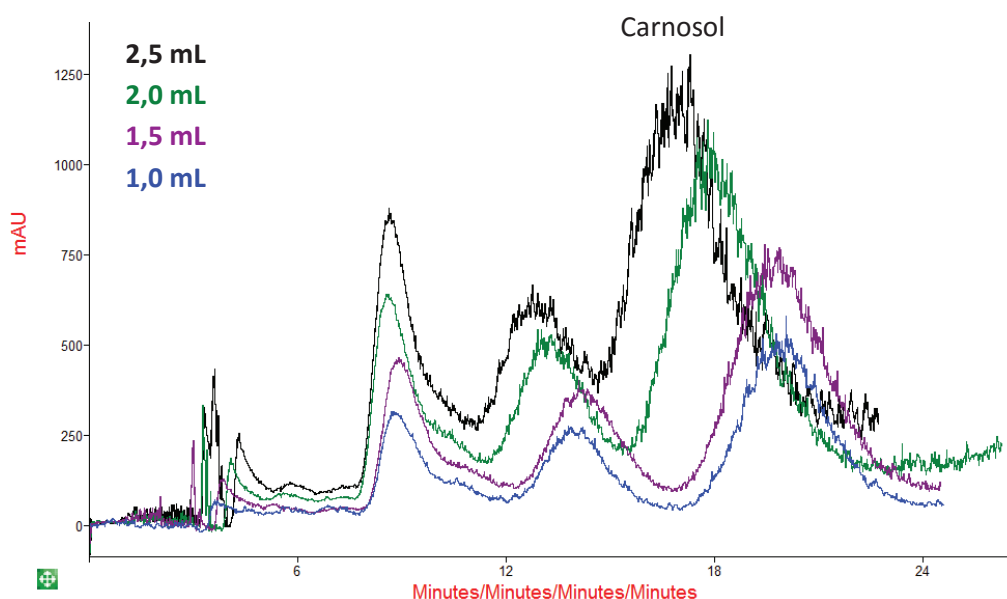


Figure 49 : Etude de la charge lors de l'injection de l'extrait éthanolique dissous en phase stationnaire du système solvant heptane/MTBE/éthanol/eau 4/1/4/1 (v/v) utilisé en mode ascendant. Injections de 1,0 mL à 2,5 mL, 2200 rpm, 5 mL/min, Sf = 54 %, P = 47 bar, détection UV $\lambda = 210$ nm.

Pour estimer la quantité maximale injectable à 10 mL/min, nous effectuons un transfert interne, selon la même méthodologie, à savoir $Q_{10\text{mL/min}} = Q_{5\text{mL/min}} \times \frac{\Delta V_{10\text{ mL/min}}}{\Delta V_{5\text{ mL/min}}}$.

La quantité à injecter à 10 mL/min est donc estimée à :

$$Q_{\text{max } 10\text{mL/min}} = 272 \times 0,7 = 190 \text{ mg soit } 1 \text{ mL d'extrait}$$

L'injection est effectuée afin de vérifier le retour à la ligne de base entre le pic de carnosol et l'impureté précédente (Figure 50). Afin de s'assurer que cette quantité de 1 mL correspond bien à la quantité maximale injectable, un volume de 1,5 mL est également injecté. L'observation du chromatogramme montre que le retour à la ligne de base est bien respecté avant et après le pic de carnosol pour l'injection de 1 mL. En revanche, le retour à la ligne de base n'est pas observé dans le cas de l'injection d'un volume égal à 1,5 mL. Il y a donc bien surcharge dans ce cas, et donc diminution de la pureté.

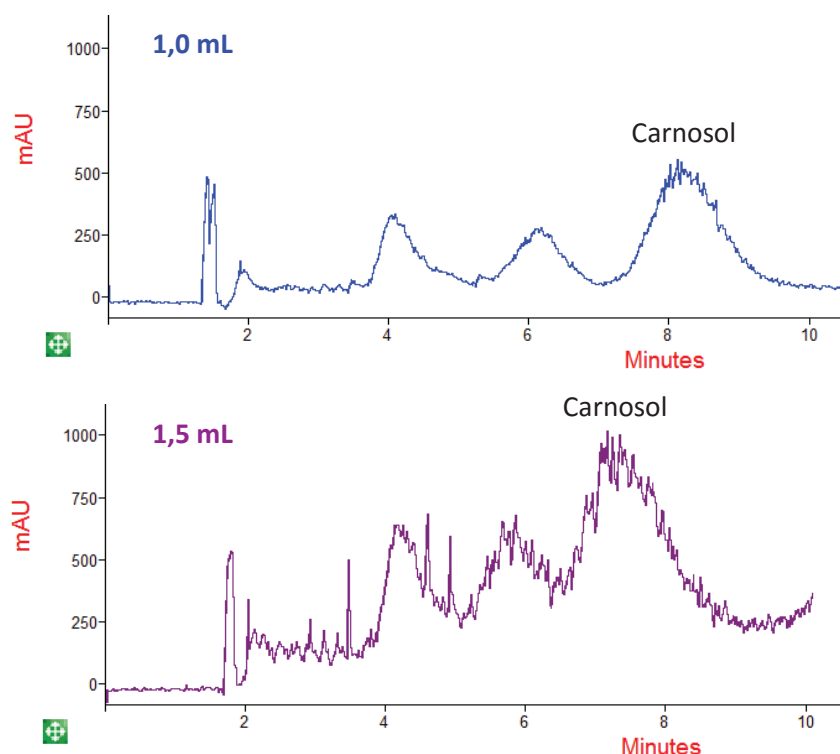


Figure 50 : Injection chargée de l'extrait éthanolique dissous en phase stationnaire du système solvant heptane/MTBE/éthanol/eau 4/1/4/1 (v/v) utilisé en mode ascendant. Injection de 1,0 mL et 1,5 mL, 2200 rpm, 10 mL/min, Sf = 46 %, P = 46 bar, détection UV $\lambda = 210$ nm.

Les espaces disponibles entre les pics ΔV et la quantité maximale injectable sur le rotor analytique 35 mL ayant été déterminés à 5 mL/min et 10 mL/min, le transfert vers le rotor 254 mL peut être à présent effectué.

5.2. Transfert sur rotor semi-préparatif 254 mL

La méthode ayant été développée et optimisée sur le rotor analytique de 35 mL, un changement d'échelle peu à présent être envisagé sur le rotor semi-préparatif de 254 mL. La méthodologie de scale-up développée au laboratoire implique dans un premier temps la réalisation de quelques injections analytiques dans le but de déterminer l'espace disponible entre les pics mais aussi d'évaluer à quel débit il est intéressant de travailler en fonction de l'objectif de production.

Dans cette section, un essai de scale-up linéaire, fidèle aux méthodologies de transferts développées dans la littérature sera également testé afin de vérifier la pertinence de notre approche.

5.2.1. Injections analytiques et choix des conditions opératoires

Le choix de la force centrifuge est orienté vers une vitesse de rotation la plus élevée possible tout en restant en dessous de la pression maximale autorisée. Ainsi, en fixant le débit à 20 mL/min, une vitesse de rotation égale à celle utilisée sur le rotor 35 mL soit 2200 rpm est dans un premier temps testée. La pression dépassant les 70 bar lors de l'équilibrage de la colonne, la manipulation est arrêtée afin de tester des vitesses de rotation inférieures, jusqu'à atteindre des pressions correctes lors de l'équilibrage de la colonne puis durant l'élution. En diminuant la vitesse de rotation de 200 en 200 rpm, le choix est arrêté à 1800 rpm (pression lors de l'équilibrage inférieure à 70 bar et pression à l'injection égale à 54 bar). Il est à noter qu'aucune injection d'échantillon n'a été nécessaire à ce stade.

La vitesse de rotation ayant été fixée, des débits compris entre 20 et 50 mL/min (par paliers de 10 mL/min) sont testés par injection d'une quantité analytique d'échantillon de romarin (2,5 mL = 1% du volume colonne). L'espace disponible entre les pics ΔV et les valeurs des $\Delta V/t$ indiquant à quel débit se situe la meilleure productivité sont déterminés (Figure 51).

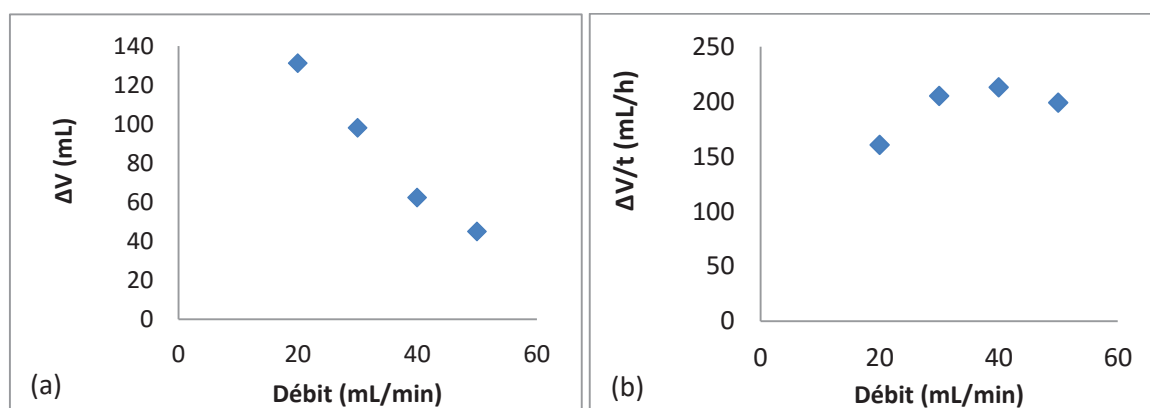


Figure 51 : Evolution (a) du ΔV et (b) du $\Delta V/t$ entre les pics de carnosol et l'impureté précédente en fonction du débit sur le rotor semi-préparatif 254 mL à 1800 rpm.

L'observation des résultats montre que l'espace disponible maximal ΔV_{\max} entre les pics se situe à 20 mL/min dans la gamme de débits testés tandis que le $\Delta V/t$ maximal se situe à 40 mL/min. Ces deux débits seront donc choisis afin de réaliser le scale-up entre le rotor analytique 35 mL et le rotor semi-préparatif 254 mL. Les valeurs des ΔV à ΔV_{\max} et $\Delta V/t_{\max}$ sont regroupées dans le Tableau 24.

Tableau 24 : Valeurs des ΔV entre les pics de carnosol et l'impureté précédente à ΔV_{\max} et $\Delta V/t_{\max}$ sur le rotor 254 mL utilisé en système solvant heptane/MTBE/éthanol/eau 4/1/4/1 (v/v) à 1800 rpm.

Objectif	Critère	Débit	Valeur du ΔV
Opération	ΔV_{\max}	20 mL/min	131,3 mL
Productivité	$\Delta V/t_{\max}$	40 mL/min	62,5 mL

5.2.2. Transfert d'échelle à charge maximale par opération

Le premier transfert d'échelle depuis le rotor analytique 35 mL vers le rotor semi-préparatif 254 mL est réalisé à 20 mL/min afin de réaliser la charge la plus grande possible sur une opération.

A l'aide des espaces disponibles entre le pic de carnosol et l'impureté précédente sur le rotor 35 mL (débit = 5 mL/min) et le rotor 254 mL (débit = 20 mL/min), le facteur de scale-up pour une opération unitaire est de 7,0.

$$F_{SU} = \frac{131,3}{18,7} = 7,0$$

La quantité maximale injectable sur le rotor analytique utilisé à 5 mL/min étant de 272 mg, la quantité à injecter sur le rotor semi-préparatif 254 mL est donc de :

$$Q_{\max.inj.254mL} = 272 \times 7,0 = 1904 \text{ mg}$$

A 20 mL/min, il est donc possible d'injecter 1904 mg d'échantillon de romarin soit un volume de 10,5 mL. Cette injection préparative est réalisée et comparée avec celle réalisée sur le rotor analytique 35 mL à 5 mL/min. L'observation des résultats (Figure 52) montre que les chromatogrammes sont identiques, ce qui garantit une pureté identique. Un retour à la ligne de base est bien observé entre le pic de carnosol et l'impureté précédente.

L'observation des quantités injectées pour chaque rotor (Tableau 25, en fin de chapitre) montre que dans le cas d'une opération unitaire, le rotor semi-préparatif peut traiter au maximum 7 fois plus d'échantillon que le rotor de laboratoire, soit une quantité équivalente au rapport des volumes colonne (d'une valeur de 7,3).

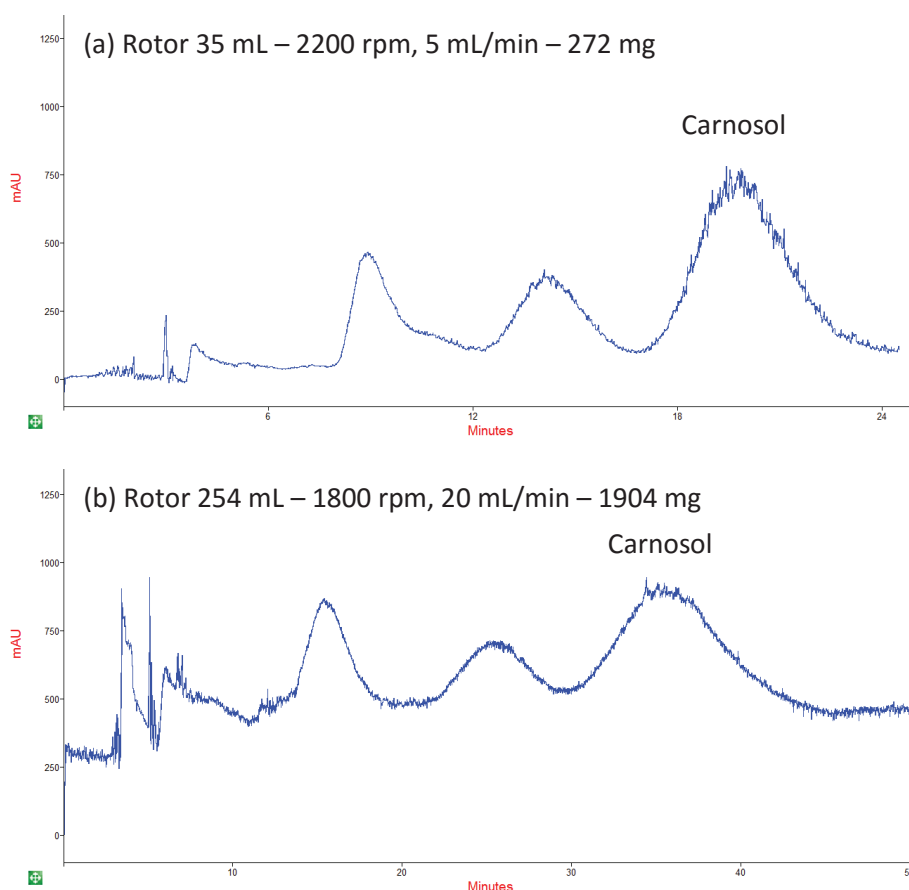


Figure 52 : Injections préparatives de l'extrait de romarin. Système solvant heptane/MTBE/éthanol/eau 4/1/4/1 (v/v) utilisé en mode ascendant. (a) Rotor analytique 35 mL, 2200 rpm, 5 mL/min, $V_{inj} = 1,5$ mL, $Sf = 54$ %, $P = 47$ bar, durée d'opération (équilibre + élution + extrusion) = 39 min. (b) Rotor semi-préparatif 254 mL, 1800 rpm, 20 mL/min, $V_{inj} = 10,5$ mL, $Sf = 66$ %, $P = 54$ bar, durée d'opération (équilibre + élution + extrusion) = 71 min. Détection UV $\lambda = 210$ nm.

5.2.3. Transfert d'échelle à productivité maximale

Dans le but d'augmenter la productivité sur le rotor semi-préparatif, il est recommandé d'augmenter le débit d'élution jusqu'à 40 mL/min. Afin de déterminer la quantité maximale injectable, il suffit comme précédemment de faire le produit du rapport des espaces disponibles ΔV entre le pic de carnosol et son impureté précédente entre le rotor analytique et le rotor semi-préparatif et de le multiplier par la quantité maximale injectable sur le rotor analytique.

En réalisant les mêmes calculs que précédemment, à 40 mL/min, il est possible d'injecter 898 mg d'échantillon de romarin soit un volume de 5 mL. L'injection préparative de 5 mL de romarin est réalisée et comparée avec celle réalisée sur le rotor analytique 35 mL à 10 mL/min (productivité horaire maximale).

L'observation des résultats (Figure 53) montre que les chromatogrammes sont identiques. Un retour à la ligne de base est bien observé entre le pic de carnosol et l'impureté précédente.

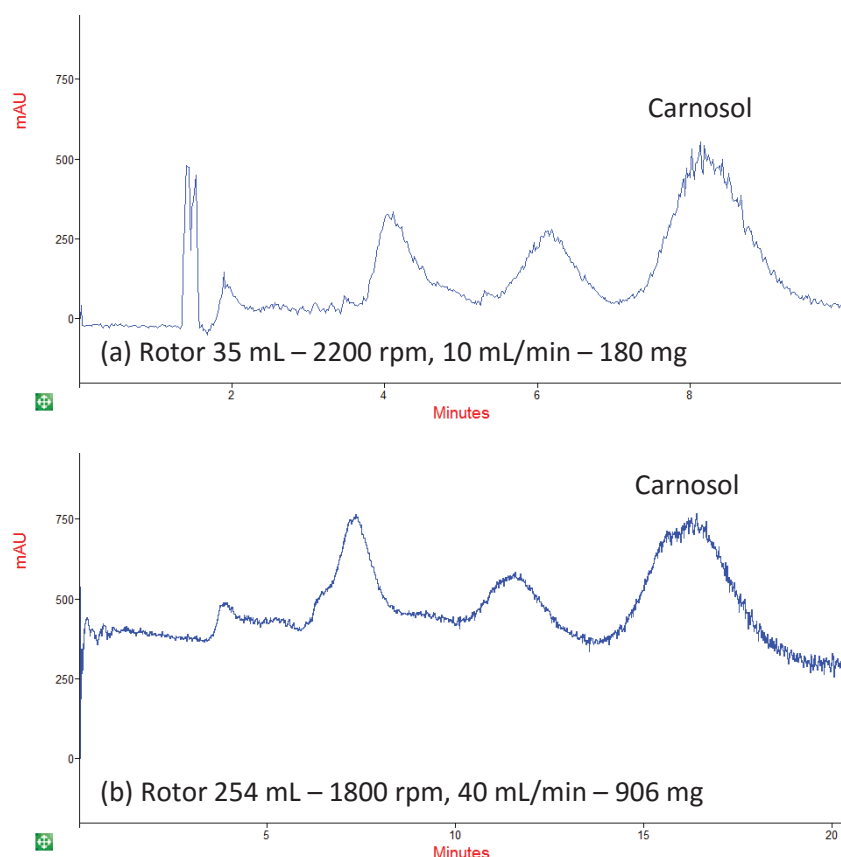


Figure 53 : Injections préparatives de l'extrait de romarin. Système solvant heptane/MTBE/éthanol/eau 4/1/4/1 (v/v) utilisé en mode ascendant. (a) Rotor analytique 35 mL, 2200 rpm, 10 mL/min, $V_{inj} = 1$ mL, $Sf = 46$ %, $P = 46$ bar, durée d'opération (équilibre + élution + extrusion) = 17 min. (b) Rotor semi-préparatif 254 mL, 1800 rpm, 40 mL/min, $V_{inj} = 5$ mL, $Sf = 46$ %, $P = 47$ bar, durée d'opération (équilibre + élution + extrusion) = 33 min. Détection UV $\lambda = 210$ nm.

Pour chaque rotor, la quantité d'échantillon traitée par heure et la productivité en carnosol a bien augmenté. En effet, elle passe de 3,1 mg de carnosol/h sur le rotor 35 mL à 8,3 mg de carnosol/h sur le rotor 254 mL. Ainsi, en réalisant un changement d'échelle à productivité maximale, cette dernière est augmentée par 2,7. Ces résultats sont consultables Tableau 25 en fin de chapitre.

5.2.4. Scale-up linéaire

L'observation des résultats précédents montre qu'à opération unitaire, le rapport de transfert est quasi-égal au rapport des volumes colonne. A productivité maximale, le rapport de transfert est cette fois-ci inférieur au rapport des volumes colonne. Dès lors, on peut se demander si un transfert linéaire tel que recommandé dans la littérature (1) ne serait pas envisageable.

Pour vérifier cette hypothèse, la méthode initiale sélectionnée sur rotor analytique 35 mL est celle réalisée à 5 mL/min. Pour rappel, la quantité maximale injectable sur ce rotor dans ces conditions est de 272 mg (soit 1,5 mL d'extrait).

Le rapport des volumes colonne étant de 7,3, la méthodologie recommande de se placer à champ centrifuge constant ; à débit proportionnel au rapport des volumes colonne, soit 37 mL/min, et d'injecter $7,3 \times 272$ mg soit environ 1986 mg, ce qui équivaut à 11 mL d'extrait.

Le rayon des rotors étant le même, la vitesse de rotation doit être identique pour conserver un champ centrifuge constant. Or il a été montré précédemment que la vitesse de rotation sur la colonne 254 mL ne pouvait pas être fixée à 2200 rpm car elle engendre trop de pression pour les raccords rotatifs du rotor. La vitesse de rotation maximale est 1800 rpm pour le rotor semi-préparatif 254 mL.

Une injection préparative de 11 mL de romarin est donc réalisée sur le rotor semi-préparatif 254 mL à 1800 rpm et 37 mL/min pour évaluer l'intérêt d'un transfert linéaire (Figure 54).

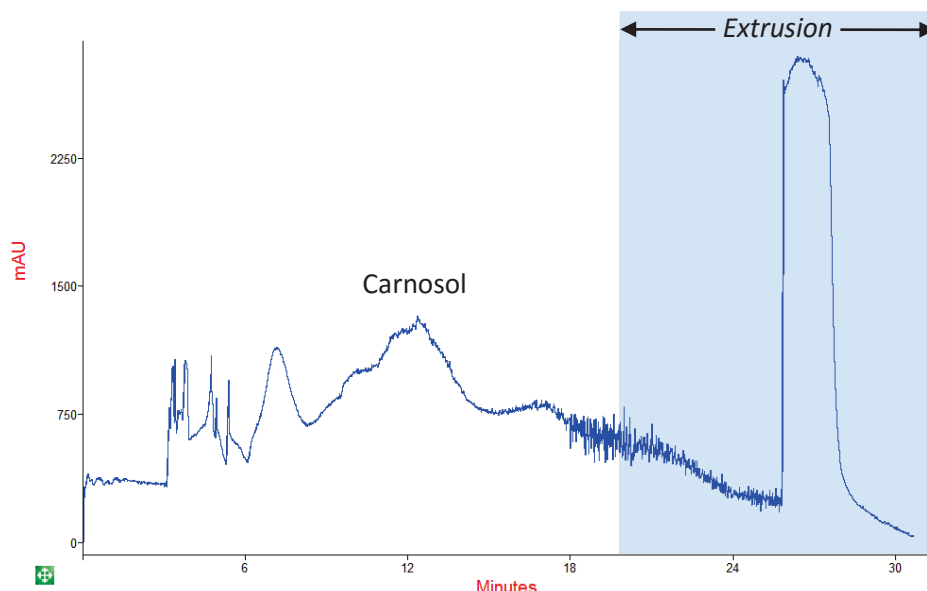


Figure 54 : Injection préparative de l'extrait de romarin. Système solvant heptane/MTBE/éthanol/eau 4/1/4/1 (v/v) utilisé en mode ascendant. Rotor semi-préparatif 254 mL, 1800 rpm, 40 mL/min, $V_{inj} = 11$ mL, $Sf = 46$ %, $P = 47$ bar, détection UV $\lambda = 210$ nm. Extrusion à 20 minutes.

L'observation de la Figure 54 montre que le carnosol n'est pas séparé de l'impureté précédente. En effet, il apparaît un épaulement en amont du composé d'intérêt (pic à 10 minutes). De plus, il semble qu'une co-élution apparaît également après le pic du carnosol.

Ces résultats montrent que dans le cas de la purification du carnosol par chromatographie de partage centrifuge, il n'est pas possible de réaliser un scale-up linéaire tel que le montrent les publications rédigées à ce sujet. En effet, le fait d'imposer certaines conditions opératoires n'est pas compatible avec la CPC notamment à cause des problèmes de pression ou du changement de design de cellules entre les rotors, qui engendre un comportement différent du système solvant et des solutés au sein de la colonne. En revanche, la méthodologie mise en place au sein du laboratoire permet l'augmentation de la production par le transfert vers un rotor semi-préparatif même si cette augmentation n'est pas liée au volume colonne. Le fait de pouvoir choisir les conditions opératoires permet donc à l'utilisateur de ne pas être limité par l'instrument mais de composer avec ce qu'il possède. Ce choix dans les conditions opératoires permet également de les adapter en fonction de l'objectif de production.

5.3. Transfert sur un rotor préparatif 812 mL

La méthode de purification du carnosol est à présent transférée sur un rotor préparatif 812 mL composé de 600 cellules, afin de montrer les potentialités de la méthodologie de scale-up sur un rotor industriel et de tenter d'augmenter la production. Ce rotor, comportant des cellules de volume beaucoup plus important que celles des rotors 35 et 254mL est déjà utilisé en production industrielle.

5.3.1. Détermination des conditions opératoires initiales

Dans cette section, la méthodologie de transfert est testée à deux débits différents, arbitrairement sélectionnés comme étant les débits à ΔV_{\max} et $\Delta V/t_{\max}$. En effet, n'étant pas équipés comme un laboratoire de production en termes de gestion des solvants et des déchets, nous ne pouvons pas déterminer les vrais paramètres expérimentaux permettant d'opérer à l'optimum du rotor.

La vitesse de rotation maximale d'utilisation pour ce rotor est de 2000 rpm. Il n'est pas possible de tourner plus vite car il existe des risques de torsion de l'axe central du bâti à cause du poids important du rotor (37 kg).

Le volume du rotor étant relativement important et donc consommateur de solvants, les premières manipulations visant à tester les conditions opératoires adaptées sont réalisées sans injection d'échantillon afin de ne pas souiller les phases et ainsi de pouvoir réutiliser intégralement le système solvant. Afin d'évaluer les capacités rétentives du rotor, le taux de phase stationnaire est donc estimé par déplacement.

Afin d'obtenir une rétention de phase stationnaire et une efficacité les plus importants possibles, une première manipulation est réalisée à vitesse de rotation maximale soit 2000 rpm et à débit faible de 50 mL/min afin d'obtenir une grande productivité unitaire. Lors de l'équilibrage, la pression maximale étant de 69 bar, trop proche des 70 bar maximum autorisés, la manipulation est stoppée afin de redémarrer à une vitesse de rotation légèrement plus faible. Une vitesse de rotation de 1800 rpm est donc appliquée pour un même débit de phase mobile de 50 mL/min. La pression maximale atteinte lors de l'équilibrage étant de 59 bar, les conditions sont validées pour une première injection du romarin. Dans ces conditions, le taux de phase stationnaire est de 68 %.

5.3.2. Injection de l'échantillon de romarin sur rotor préparatif

5.3.2.1. Transfert à 50 mL/min

Comme proposé dans la méthodologie de changement d'échelle, une injection analytique de l'échantillon à purifier est dans un premier temps réalisée. Pour cela, un volume d'échantillon de 8 mL (1% du volume colonne) est traité (Figure 55). Le profil chromatographique est très similaire aux chromatogrammes obtenus lors des expériences précédentes, permettant aisément de reconnaître le pic du carnosol à un temps de rétention d'environ 60 minutes.

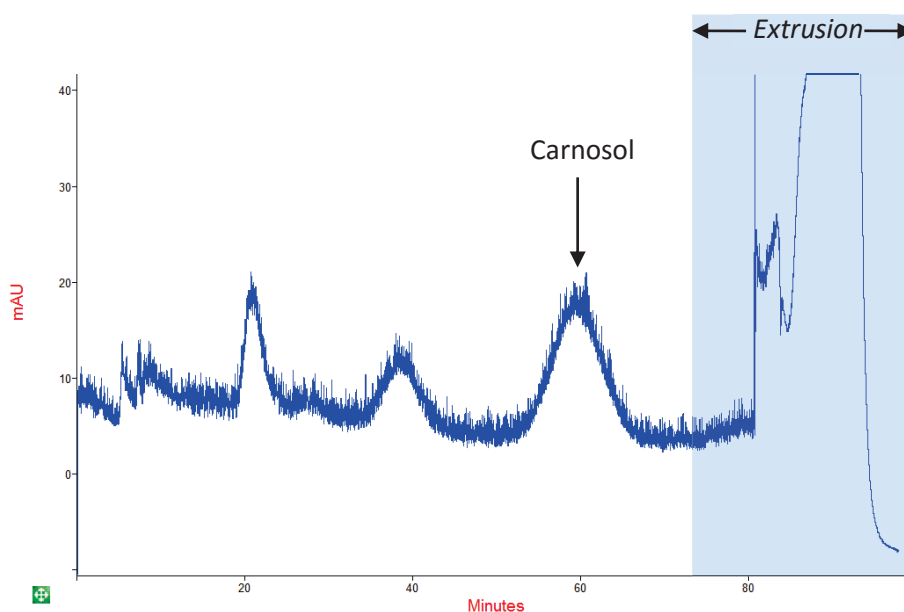


Figure 55 : Injection analytique de 8 mL (1,45 g) d'extract de romarin ; volume rotor 812 mL ; système solvant heptane/MTBE/éthanol/eau 4/1/4/1 (v/v), mode ascendant, 1800 rpm, 50 mL/min ; extrusion à 75 minutes ;
 $P_{\text{max.équil}} = 60$ bar, $P_{\text{injection}} = 53$ bar, $P_{\text{extrusion}} = 48$ bar, $S_f = 68$ %, détection UV $\lambda = 210$ nm.

A partir de cette injection analytique, l'espace disponible ΔV entre le pic de carnosol et l'impureté précédente est calculé à 602 mL. A l'aide de cette valeur et des résultats préalablement obtenus sur le rotor 35 mL (Figure 55), la quantité maximale injectable sur le rotor 812 mL dans les conditions opératoires 1800 rpm, 50 mL/min est estimé à 8,7 g soit 48 mL. Le volume réellement injecté est de 50 mL soit 9 g (Figure 56).

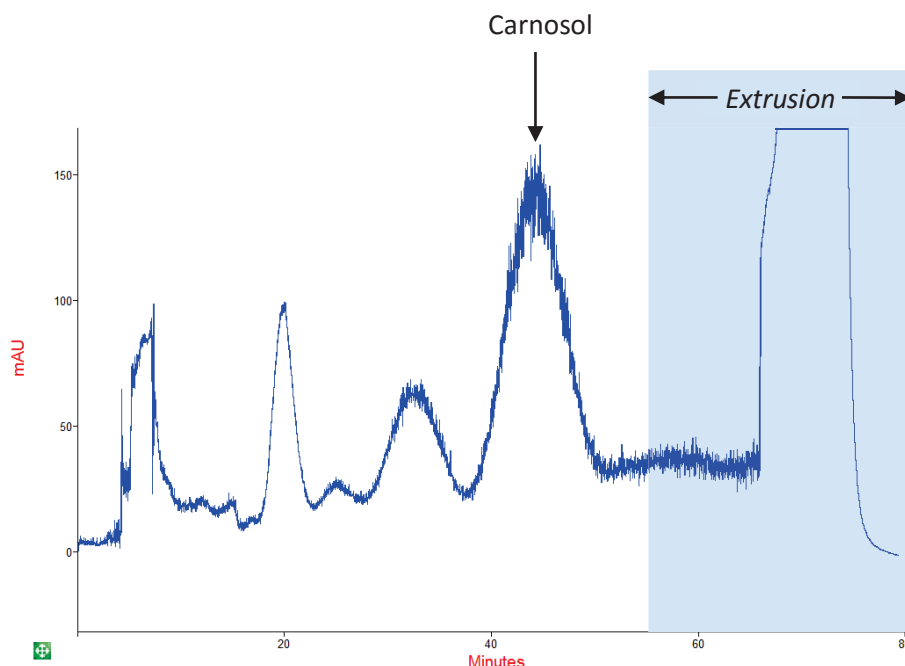


Figure 56 : Injection préparative de 50 mL (9,04 mg) d'extrait de romarin ; volume rotor 812 mL ; système solvant heptane/MTBE/éthanol/ eau 4/1/4/1 (v/v), mode ascendant, 1800 rpm, 50 mL/min ; extrusion à 55 minutes ; $P_{\text{max.équil}} = 59$ bar, $P_{\text{injection}} = 53$ bar, $P_{\text{extrusion}} = 37$ bar, $S_f = 68\%$, détection UV $\lambda = 210$ nm.

Lors de l'injection préparative, on observe une diminution de pression (de 53 à 37 bar) beaucoup plus importante que lors de l'injection analytique, pouvant être relié à une perte plus importante de phase stationnaire au cours de l'opération. La cause la plus probable viendrait de l'injection d'une quantité très importante d'échantillon dilué en phase stationnaire qui provoquerait un léger déséquilibre de la colonne et un effet de flooding (= perte régulière de phase stationnaire).

Un retour à la ligne de base est observé entre le pic de carnosol et l'impureté précédente. Le chromatogramme est similaire aux résultats obtenus sur rotor 35 mL et 254 mL. Le changement d'échelle est donc considéré comme satisfaisant. Dans ces conditions, la production unitaire est de 9 g d'extrait traité par opération.

5.3.2.2. Augmentation de la productivité : essais à 100 mL/min

Une seconde campagne d'essais est menée à même vitesse de rotation (1800 rpm) mais à un débit de 100 mL/min afin de se placer à productivité plus importante ($\Delta V/t$ plus important). Dans ces conditions, le taux de phase stationnaire est de 49 %. Comme dans le cas précédent, une injection analytique de 8 mL d'échantillon de romarin à 181 mg/mL est réalisée afin d'en déduire l'espace disponible entre le pic de carnosol et l'impureté précédente (Figure 57).

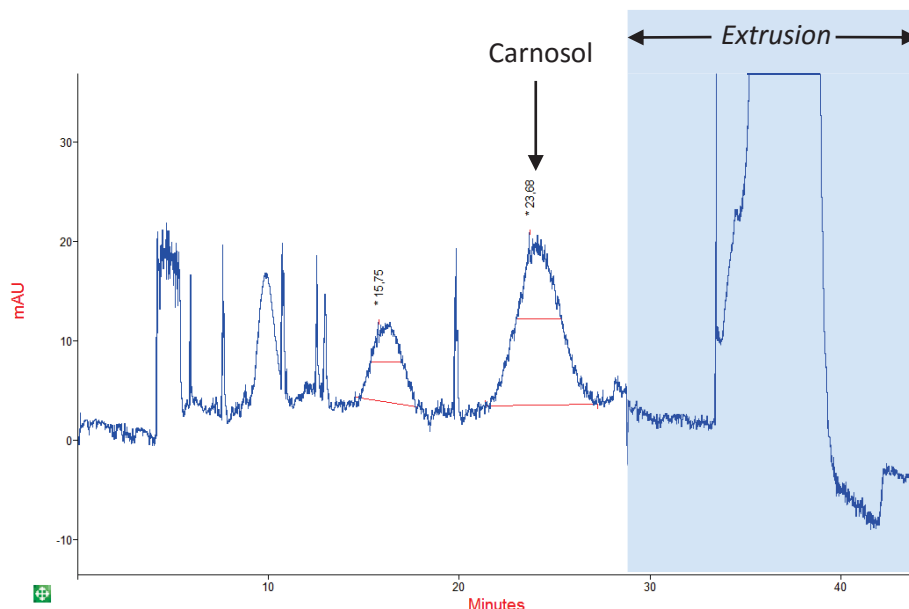


Figure 57 : Injection analytique de 8 mL (1,45 g) d'extract de romarin ; volume rotor 812 mL ; système solvant heptane/MTBE/éthanol/eau 4/1/4/1 (v/v), mode ascendant, 1800 rpm, 100 mL/min ; extrusion à 28 minutes ; $P_{\text{max.équil}} = 74$ bar, $P_{\text{injection}} = 57$ bar, $P_{\text{extrusion}} = 66$ bar, $S_f = 49\%$, détection UV $\lambda = 210$ nm.

A partir de cette injection analytique, l'espace disponible entre le pic de carnosol et l'impureté précédente est calculé à un ΔV de 431 mL. A l'aide de cette valeur et des résultats préalablement obtenus sur le rotor 35 mL, le facteur de transfert est estimé à 23. La quantité maximale injectable sur le rotor 812 mL dans les conditions opératoires 1800 rpm et 100 mL/min est de 6,3 g soit un volume de 34,6 mL. Une injection de 35 mL d'extract de romarin est alors réalisée (Figure 58).

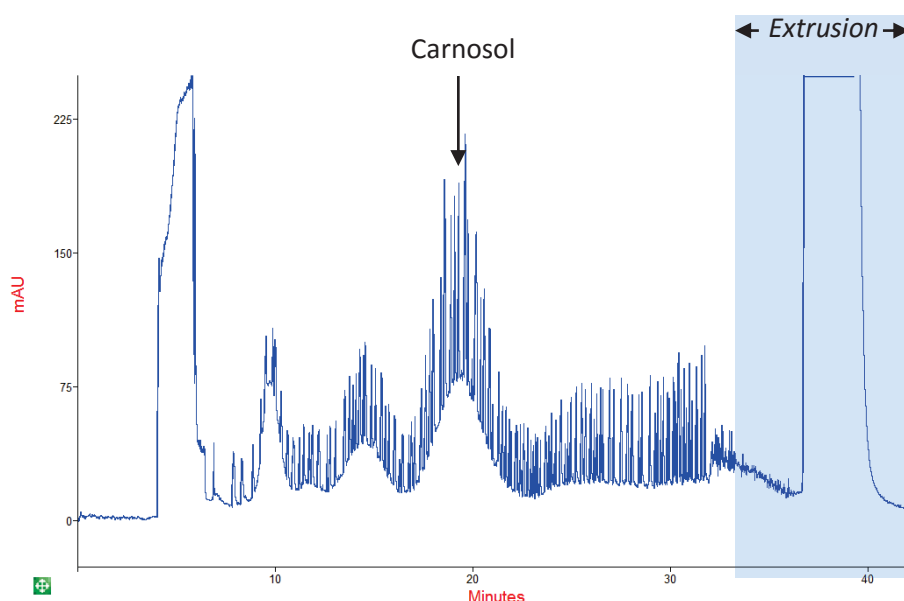


Figure 58 : Injection préparative de 35 mL (6,32 g) d'extract de romarin ; volume rotor 812 mL ; système solvant Heptane/MTBE/Ethanol/ Eau 4/1/4/1 (v/v), mode ascendant, 1800 rpm, 100 mL/min ; extrusion à 35 minutes ; $P_{\text{max.équil}} = 69$ bar, $P_{\text{injection}} = 54$ bar, $P_{\text{extrusion}} = 42$ bar, $S_f = 49\%$, détection UV $\lambda = 210$ nm.

Le chromatogramme observé en Figure 58 montre beaucoup de bruit tout au long du chromatogramme. Ce bruit est dû à la perte régulière de fines gouttelettes de phase stationnaire (observée en sortie de colonne) probablement en lien avec la quantité importante d'échantillon injectée couplé au fort débit de phase mobile appliqué.

Malgré le niveau de bruit sur le chromatogramme, la séparation du carnosol et de l'impureté précédente semble satisfaisante.

Avec le système solvant heptane/MTBE/éthanol/eau en proportions 4/1/4/1 (v/v) il a donc été possible de travailler sur le rotor 812 mL jusqu'à une vitesse de rotation de 1800 rpm et ceci à des débits de 50 et 100 mL/min avec de bons taux de phase stationnaire (68% à 50 mL/min et 49% à 100 mL/min). Le rotor a également été testé à 2000 rpm et 50 mL/min mais la pression lors de l'équilibrage ayant été estimée trop importante, ces conditions n'ont pas été retenues pour la purification du carnosol.

5.3.3. Comparaison des résultats obtenus sur les différents rotors

D'après les résultats obtenus sur le rotor 812 mL, un tableau comparatif des performances de ce dernier avec les rotors 35 mL et 254 mL est réalisé afin de pouvoir observer les quantités traitées et produites en fonction des objectifs de production (Tableau 25).

Le Tableau 25 montre que pour un changement d'échelle d'un facteur 7,3 entre les rotors 35 mL et 254 mL, il est possible d'injecter 6,8 fois plus d'échantillon ou d'augmenter la productivité de 2,7 fois. Lors du transfert entre le rotor 35 mL et le rotor 812 mL (x 23 en volume), il est possible d'injecter 32 fois plus d'échantillon ou d'augmenter la productivité d'un facteur 16 pour une consommation de solvants seulement 10 fois plus importante. La quantité maximale injectée sur le rotor 812 mL est de 9 g d'échantillon pour une purification de 45 mg de carnosol.

Du fait de son grand volume et de sa plage d'utilisation à des débits élevés, le rotor 812 mL n'a été testé que sur un nombre restreint de manipulations afin de consommer une quantité de solvants la plus faible possible. L'intérêt de la réalisation d'un développement de méthode sur un rotor de faible volume puis de son transfert vers le rotor 812 mL a ici bien été démontré. En effet, il n'aurait pas été possible de développer la méthode directement sur un rotor de cette capacité tant la consommation de solvants aurait été importante.

Tableau 25 : Comparaison des performances de 3 rotors Kromaton lors de la purification du carnosol provenant d'un extrait éthanolique de Romarin.

	Echelle laboratoire $V_{\text{colonne}} = 35 \text{ mL}$ $n_{\text{cellules}} = 832$		Echelle semi-préparative $V_{\text{colonne}} = 254 \text{ mL}$ $n_{\text{cellules}} = 840$		Echelle préparative $V_{\text{colonne}} = 812 \text{ mL}$ $n_{\text{cellules}} = 600$	
	Opération unitaire ΔV_{max}	Productivité $\Delta V/t_{\text{max}}$	Opération unitaire ΔV_{max}	Productivité $\Delta V/t_{\text{max}}$	Opération unitaire ΔV_{max}	Productivité $\Delta V/t_{\text{max}}$
Débit	5 mL/min	10 mL/min	20 mL/min	40 mL/min	50 mL/min	100 mL/min
Vitesse de rotation Force centrifuge	2200 rpm 545 g		1800 rpm 365 g		1800 rpm 365 g	
Taux de phase stationnaire	54 %	46 %	66 %	46 %	68 %	49 %
Pression	48 bar	46 bar	54 bar	47 bar	53 bar	54 bar
Volume injecté	1,5 mL	1 mL	10,5 mL	5 mL	50 mL	35 mL
Durée d'une opération*	39 min 0,65 h	17 min 0,28 h	71 min 1,18 h	33 min 0,55 h	83 min 1,38 h	38 min 0,63 h
Masse de romarin injectée	0,27 g	0,18 g	1,90 g	0,90 g	9,04 g	6,32 g
Quantité de romarin traitée/h	0,42 g/h	0,64 g/h	1,61 g/h	1,64 g/h	6,53 g/h	9,99 g/h
Production carnosol/opération	1,4 mg	0,9 mg	9,5 mg	4,5 mg	45,0 mg	31,5 mg
Production carnosol/h	2,1 mg/h	3,1 mg/h	7,9 mg/h	8,3 mg/h	32,3 mg/h	49,4 mg/h
Consommation solvants/opération	0,13 L	0,10 L	0,92 L	0,80 L	2,55 L	2,20 L
Consommation solvants/h	0,19 L/h	0,35 L/h	0,77 L/h	1,47 L/h	1,83 L/h	3,45 L/h



*Une opération comprend l'équilibrage (1 volume colonne), l'élution et l'extrusion (1 volume colonne). Le débit reste constant durant les 3 étapes.

6. Conclusion et perspectives

Ce chapitre a permis de montrer qu'il était possible de réaliser un transfert entre deux colonnes hydrostatiques de volumes, de nombre de cellules et de design de cellules totalement différents. Pour cela, des exemples de changement d'échelle ont été mis en œuvre dans un premier temps sur la séparation de molécules test (composés Guess) puis dans un second temps sur un échantillon réel provenant d'un extrait végétal de romarin. Pour chaque application, le scale-up a été réalisé de manière satisfaisante depuis le rotor de laboratoire 35 mL vers deux autres rotors de volumes différents.

Contrairement aux changements d'échelle linéaires réalisés dans la littérature, la nouvelle méthodologie mise en place ici ne fonctionne pas sur l'application de conditions opératoires imposées. Ici, l'utilisateur peut se permettre de choisir la vitesse de rotation et le débit en fonction d'une part des contraintes instrumentales, mais aussi en fonction de son objectif de production : injecter une grande quantité d'échantillon sur une opération ou augmenter la productivité en réalisant un grand nombre d'injections de faible volume mais à débit plus rapide. Ce choix des conditions opératoires peut parfois induire des calculs de facteurs de transfert d'échelle inférieurs au rapport des volumes colonne, mais la quantité à injecter pourra cependant toujours être prédite.

Cette méthodologie comporte cependant quelques limites. Tout d'abord, le taux de phase stationnaire doit nécessairement être identique pendant l'étude de charge sur un même rotor. En effet, si une forte diminution de phase stationnaire est observée sur l'injection préparative, la résolution entre les pics diminuera, empêchant l'utilisateur de rester dans les spécifications en termes de pureté. La quantité maximale injectable sera alors surestimée. D'autre part, comme indiqué dans la publication associée à ce chapitre (27) la résolution entre les pics lors du développement analytique doit être supérieure à 1 afin d'avoir des pics assez séparés pour calculer un ΔV ($R_s > 1$, $\Delta V > 0$). Enfin, cette méthodologie ne s'applique pour l'instant qu'au mode élution, les autres modes tels que le pH-zone refining ou le mode élution-extrusion n'ayant pas été testés.

L'intérêt de réaliser un développement de méthode et une optimisation de la charge sur un rotor analytique a parfaitement été démontré. En effet, en travaillant à petite échelle, la consommation de solvants est réduite puisque dans le cas du romarin nous avons pu diminuer jusqu'à 18 fois la quantité de solvants usés par heure par rapport à l'utilisation du rotor à échelle préparative. La gestion des déchets est donc grandement facilitée en travaillant à petite échelle. De plus, l'utilisation du rotor de développement nous a permis de travailler plus vite, puisque le temps de purification est environ deux fois plus faible lors de l'utilisation du rotor 35 mL. A cela doit être ajouté le temps de préparation du système solvant qui est largement augmenté lors de l'utilisation d'un rotor préparatif puisque le besoin initial en solvants est beaucoup plus grand. Enfin, la quantité d'échantillon utilisé est également réduite sur un rotor analytique puisque lors du développement de méthode, 1% du volume colonne doit être injecté, tout comme l'étude de charge à petite échelle dont l'injection d'échantillon est moindre.

Les aspects économiques et écologiques ont ainsi pu être conciliés à travers la mise en place de cette méthodologie de scale-up puisqu'en développant une méthode dans un premier temps à petite échelle, l'opérateur travaille plus vite tout en consommant moins de solvants et rejetant donc moins de déchets, limitant ainsi l'impact environnemental et financier du procédé. Afin de poursuivre cette amélioration des procédés d'un point de vue écologique, il serait intéressant d'introduire en chromatographie de partage centrifuge une modification de la nature des solvants utilisés, bien souvent toxiques pour l'homme et l'environnement. Ainsi, l'heptane ou le MTBE utilisés dans la purification du carnosol pourraient être remplacés par d'autres solvants plus respectueux, issus de ressources renouvelables et

moins dangereux pour la santé des opérateurs. C'est ce que nous nous proposons de réaliser dans le chapitre suivant en effectuant une étude sur l'effet de la substitution de l'heptane par du limonène, et du MTBE par de l'acétate d'éthyle, deux solvant agro-sourcés.

Références

1. P. Wood, S. Ignatova, L. Janaway, D. Keay, D. Hawes, I. Garrard, I. A. Sutherland, Counter-current chromatography separation scaled up from an analytical column to a production column. *Journal of Chromatography A* **1151**, 25-30 (2007).
2. H. Luo, M. Peng, H. Ye, L. Chen, A. Peng, M. Tang, F. Zhang, J. Shi, Predictable and linear scale-up of four phenolic alkaloids separation from the roots of *Menispermum dauricum* using high-performance counter-current chromatography. *Journal of Chromatography B* **878**, 1929-1933 (2010).
3. L. Chen, Q. Zhang, G. Yang, L. Fan, J. Tang, I. Garrard, S. Ignatova, D. Fisher, I. A. Sutherland, Rapid purification and scale-up of honokiol and magnolol using high-capacity high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **1142**, 115-122 (2007).
4. I. Sutherland, P. Hewitson, S. Ignatova, Scale-up of counter-current chromatography: Demonstration of predictable isocratic and quasi-continuous operating modes from the test tube to pilot/process scale. *Journal of Chromatography A* **1216**, 8787-8792 (2009).
5. I. Sutherland, P. Hewitson, S. Ignatova, New 18-l process-scale counter-current chromatography centrifuge. *Journal of Chromatography A* **1216**, 4201-4205 (2009).
6. I. Sutherland, C. Thickitt, N. Douillet, K. Freebairn, D. Johns, C. Mountain, P. Wood, N. Edwards, D. Rooke, G. Harris, D. Keay, B. Mathews, R. Brown, I. Garrard, P. Hewitson, S. Ignatova, Scalable Technology for the Extraction of Pharmaceuticals: Outcomes from a 3 year collaborative industry/academia research programme. *Journal of Chromatography A* **1282**, 84-94 (2013).
7. Y. Yuan, B. Wang, L. Chen, H. Luo, D. Fisher, I. A. Sutherland, Y. Wei, How to realize the linear scale-up process for rapid purification using high-performance counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **1194**, 192-198 (2008).
8. C. DeAmicis, N. A. Edwards, M. B. Giles, G. H. Harris, P. Hewitson, L. Janaway, S. Ignatova, Comparison of preparative reversed phase liquid chromatography and countercurrent chromatography for the kilogram scale purification of crude spinetoram insecticide. *Journal of Chromatography A* **1218**, 6122-6127 (2011).
9. Q. Du, H. Jiang, J. Yin, Y. Xu, W. Du, B. Li, Q. Du, Scaling up of high-speed countercurrent chromatographic apparatus with three columns connected in series for rapid preparation of (-)-epicatechin. *Journal of Chromatography A* **1271**, 62-66 (2013).
10. I. A. Sutherland, G. Audo, E. Bourton, F. Couillard, D. Fisher, I. Garrard, P. Hewitson, O. Intes, Rapid linear scale-up of a protein separation by centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography A* **1190**, 57-62 (2008).
11. J. B. Friesen, G. F. Pauli, Rational development of solvent system families in counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **1151**, 51-59 (2007).
12. J. Brent Friesen, G. F. Pauli, GUESS—A generally useful estimate of solvent systems for CCC. *Journal of liquid chromatography & related technologies* **28**, 2777-2806 (2005).
13. J. B. Friesen, S. Ahmed, G. F. Pauli, Qualitative and quantitative evaluation of solvent systems for countercurrent separation. *Journal of Chromatography A* **1377**, 55-63 (2015).
14. A. P. Foucault, in *Centrifugal partition chromatography*, A. P. Foucault, Ed. (M. Dekker, 1995), chap. 4, pp. 71-97.
15. A. P. Foucault, L. Chevolot, Counter-current chromatography: instrumentation, solvent selection and some recent applications to natural product purification. *Journal of Chromatography A* **808**, 3-22 (1998).
16. A. Berthod, M. Hassoun, M. J. Ruiz-Angel, Alkane effect in the Arizona liquid systems used in countercurrent chromatography. *Analytical and bioanalytical chemistry* **383**, 327-340 (2005).
17. L. Marchal, A. Foucault, G. Patissier, J. M. Rosant, J. Legrand, Influence of flow patterns on chromatographic efficiency in centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography A* **869**, 339-352 (2000).

18. L. Marchal, J. Legrand, A. Foucault, Mass transport and flow regimes in centrifugal partition chromatography. *AIChE journal* **48**, 1692-1704 (2002).
19. D. W. Armstrong, G. L. Bertrand, A. Berthod, Study of the origin and mechanism of band broadening and pressure drop in centrifugal countercurrent chromatography. *Analytical chemistry* **60**, 2513-2519 (1988).
20. A. C. J. Hermans-Lokkerbol, A. C. Hoek, R. Verpoorte, Preparative separation of bitter acids from hop extracts by centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography A* **771**, 71-79 (1997).
21. Seidel-Morgenstern, M. Schulte, A. Epping, in *Preparative Chromatography*, H. Schmidt-Traub, M. Schulte, A. Seidel-Morgenstern, Eds. (Wiley, 2012), chap. 2, pp. 7-46.
22. B. Billardello, A. Berthod, in *Countercurrent chromatography: the support-free liquid stationary phase*, A. Berthod, Ed. (Elsevier, 2002), chap. 7, pp. 177-200.
23. C.-X. Zhao, C.-H. He, Sample capacity in preparative high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **1146**, 186-192 (2007).
24. K.-P. Hupe, B. Hoffmann, in *Preparative Scale Chromatography*, E. Grushka, Ed. (Taylor & Francis, 1988), chap. 4, pp. 77-88.
25. J. H. Knox, H. M. Pyper, Framework for maximizing throughput in preparative liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **363**, 1-30 (1986).
26. P. Gareil, C. Durieux, R. Rosset, Optimization of Production Rate and Recovered Amount in Linear and Nonlinear Preparative Elution Liquid Chromatography. *Separation Science & Technology* **18**, 441 (1983).
27. E. Bouju, A. Berthod, K. Faure, Scale-up in centrifugal partition chromatography: The “free-space between peaks” method. *Journal of Chromatography A* **1409**, 70-78 (2015).
28. S. Chollet *et al.*, Methodology for optimally sized centrifugal partition chromatography columns. *Journal of Chromatography A* **1388**, 174-183 (2015).

Chapitre 4

Solvants alternatifs

1. Introduction

À travers la mise en place d'une nouvelle méthodologie de scale-up, nous avons pu mettre en évidence dans le chapitre précédent l'un des 12 principes de la chimie verte qui consiste à prévenir et limiter la production de déchets. En effet, l'intérêt de la CPC réside dans la purification de molécules sur des appareillages de gros volumes. En développant une méthode de purification à petite échelle, l'utilisateur consomme une quantité bien moindre de solvants que s'il réalisait son développement de méthode à grande échelle. L'utilisation d'une méthode de transfert rapide et fiable entre un appareil dit analytique et un appareil de plus gros volume apparaît donc justifiée par rapport à un développement direct à grande échelle.

La CPC étant une méthode pour laquelle l'utilisation de solvants est inévitable, il apparaît également intéressant de se pencher sur un autre aspect de la chimie verte, en regardant si les solvants utilisés répondent au principe qui consiste à utiliser des solvants plus sûrs et moins toxiques, en préférant des matières premières renouvelables à celles fossiles, et en remplaçant certains solvants organiques par des solvants alternatifs.

Un solvant alternatif (ou solvant « vert ») peut être caractérisé comme un solvant répondant à un ou plusieurs critères parmi les suivants : sa faible toxicité pour l'homme, son inflammabilité, son origine bio-sourcée (ou agro-sourcée) et son impact sur l'environnement (1, 2). Selon Kerton, il existerait 7 classes de solvants verts (1, 3) :

- les agrosolvants, provenant de ressources renouvelables telle que le bois, l'amidon, les huiles végétales, les fruits ou même des plantes aromatiques (4, 5) ;
- les solvants écologiques ou « eco-friendly », respectueux de l'environnement (biodégradables) (5) et ayant un bon profil HSE (Hygiène, Sécurité, Environnement) ;
- l'eau, ressource renouvelable et non toxique ;
- les polymères liquides, non volatiles, biocompatibles et non toxiques ;
- les solvants fluorés, non inflammables et non toxiques ;
- les liquides ioniques et mélanges eutectiques, non volatiles et thermiquement stables ;
- les fluides supercritiques, inertes, recyclables, non inflammables et non toxiques.

En 2011, l'équipe de Jean-Marie Aubry (6) publie un article sur la réalisation d'une nouvelle classification de 153 solvants en fonction de leur structure moléculaire à l'aide du logiciel COSMO-RS (COnductor-like Screening MOdel for Real Solvents), permettant de prédire des données thermodynamique des systèmes liquides sans aucune donnée expérimentale (7). A la suite de cela, la même équipe publie l'année suivante un important article dans le journal *Green Chemistry* dans lequel, parmi les 153 précédents solvants, elle en distingue 138 en tant que solvants verts (Tableau 26). La sélection est réalisée selon 3 critères : la toxicité, l'inflammabilité et le profil HSE du solvant (2).

Tableau 26 : Classification de 138 solvants verts en 10 groupes (2). En vert : solvants biosourcés ou agrosolvants ; en italique : solvants acceptés pour les applications pharmaceutiques et cosmétiques ; I_{tox} est l'indice de toxicité (selon Hodge et Sterner) ; VOC = volatile organic compound (*Composé Organique Volatile*) : + pour une pression de vapeur > 10 Pa, - pour une pression de vapeur < 10 Pa ; Fire = phrase de risques concernant l'inflammabilité (n.f. = not found, *introuvable*).

NAME	I_{tox}	VOC	Fire	CAS	NAME	I_{tox}	VOC	Fire	CAS	NAME	I_{tox}	VOC	Fire	CAS
Cluster II: Weak electron pair donor bases					Cluster III: Aprotic dipolar (continued)					Cluster VII: Amphiprotic (continued)				
<i>Acetone</i>	5	+	R11	67-64-1	Methyl linoleate	5	-	-	112-63-0	Glycerol-1,2-dibutyl ether	n.f.	-	-	91337-36-9
N,N-Dimethyloctanamide	4	-	-	1118-92-9	Methyl linolenate	5	-	-	301-00-8	Glycerol-1,2-diethyl ether	n.f.	-	R10	4756-20-1
Methyl 5-(dimethylamino)-2-methyl-oxopentanoate	4	-	-	1174627-68-9	Methyl myristate	5	-	-	124-10-7	Glycerol-1,2-dimethyl ether	n.f.	+	R10	40453-77-8
2-Pyrrolidone	5	-	-	616-45-5	Methyl oleate	4	-	-	112-62-9	Glycerol-1,3-dimethyl ether	5	+	R10	623-69-8
Cluster III: Aprotic dipolar					Methyl palmitate	4	-	-	112-39-0	Glycerol-1-butyl monoether	5	-	-	624-52-2
<i>Acetyltributyl citrate</i>	6	-	-	77-90-7	Dimethyl 2-methyl glutarate	4	-	-	14035-94-0	Glycerol-1-ethyl monoether	4	-	-	1874-62-0
<i>Benzyl benzoate</i>	4	-	-	120-51-4	2-Methyltetrahydrofuran	5	+	R11	96-47-9	Glycerol-2-butyl monoether	n.f.	-	-	100078-36-2
<i>Butylacetate</i>	4	+	R10	123-86-4	Menthanyl acetate	5	-	-	58985-18-5	Glycerol-2-ethyl monoether	n.f.	-	R10	22598-16-9
<i>Butyl laurate</i>	5	-	-	106-18-3	n-Propyl acetate	5	+	R11	109-60-4	Glycofuro (n=2)	5	-	-	52814-38-7
<i>1,4-Cineol</i>	4	+	R10	470-67-7	Terpineol acetate	5	n.f.	-	8007-35-0	N,N-Diethylolcapramide	5	-	-	136-26-5
<i>1,8-Cineol</i>	4	+	R10	470-82-6	<i>Tributyl citrate</i>	5	-	-	77-94-1	Caprylic acid diethanolamide	5	-	-	3077-30-3
Cyclopentyl methyl ether	4	+	R11	5614-37-9	<i>Triethyl citrate</i>	5	-	-	77-93-0	Isoamyl alcohol	5	+	R10	123-51-3
<i>Dibutyl sebacate</i>	5	-	-	109-43-3	Cluster IV: Aprotic highly dipolar					<i>Isopropyl alcohol</i>	5	+	R11	67-63-0
Diethyl adipate	5	-	-	141-28-6	<i>Dimethyl sulfoxide</i>	5	+	-	67-68-5	Methyl ricinoleate	5	-	-	141-24-2
Diethyl glutarate	4	-	-	818-38-2	2-Furfuraldehyde *	3	+	-	98-01-1	Menthanol	5	-	-	498-81-7
<i>Diethyl phthalate</i>	5	-	-	84-66-2	Propylene carbonate	4	-	-	108-32-7	Nopol	4	-	-	128-50-7
Diethyl succinate	5	+	-	123-25-1	γ -Valerolactone	5	+	-	108-29-2	1-Octanol	4	+	-	111-87-5
Diisooamylsuccinate	n.f.	-	-	818-04-2	Cluster V: Apolar					<i>Oleic acid</i>	6	-	-	112-80-1
Diisobutyl adipate	5	-	-	141-04-8	Butyl myristate	5	-	-	110-36-1	<i>Oleyl alcohol</i>	5	-	-	143-28-2
Diisobutyl glutarate	5	-	-	71195-64-7	Butyl palmitate	5	-	-	111-06-8	PolyEthyleneGlycol 600	6	-	-	25322-68-3
Diisobutyl succinate	5	-	-	925-06-4	Butyl stearate	6	-	-	123-95-5	Solketal	5	+	-	100-79-8
Diisooctylsuccinate	n.f.	-	-	2915-57-3	Cyclohexane	5	+	R11	110-82-7	<i>Ricinoleic acid</i>	5	-	-	141-22-0
Dimethyl adipate	4	-	-	627-93-0	p-Cymene	4	+	R10	99-87-6	α -Terpineol	4	-	-	98-55-5
Dimethyl glutarate	5	+	-	1119-40-0	β -Myrcene	5	+	R10	123-35-3	β -Terpineol	5	-	-	138-87-4
<i>Dimethyl phthalate</i>	5	-	-	131-11-3	<i>Decamethylcyclopentasiloxane</i>	4	+	-	541-02-6	Tetrahydrofurfurylic alcohol	4	+	-	97-99-4
Dimethyl succinate	5	+	-	106-65-0	<i>Dipropyleneglycol</i>	5	-	-	110-98-5	Cluster VIII: Polar protic				
N,N-Dimethyldecaneamide	4	-	-	14433-76-2	<i>Ethyl oleate</i>	5	-	-	111-62-6	1,3-Dioxan-5-ol	5	+	-	4740-78-7
<i>Dimethylisobutylidene</i>	5	-	-	5306-85-4	Ethyl palmitate	5	-	-	628-97-7	1,3-Dioxolane-4-methanol	5	+	-	5464-28-8
Diocylsuccinate	n.f.	-	-	14491-66-8	<i>Isopropyl palmitate</i>	5	-	-	142-91-6	Ethylene glycol	4	+	-	107-21-1
1,3-Dioxolane	4	+	R11	646-06-0	d-Limonene	4	+	R10	5989-27-5	β -Farnesene	5	-	-	18794-84-8
<i>Ethyl acetate</i>	5	+	R11	141-78-6	Methyl stearate	5	-	-	112-61-8	Furfurylic alcohol *	3	+	-	98-00-0
<i>Ethyl laurate</i>	5	-	-	106-33-2	<i>Isododecane</i>	5	-	-	31807-55-3	<i>Glycerol</i>	5	-	-	56-81-5
<i>Ethyl linoleate</i>	5	-	-	544-35-4	Perfluorooctane	3	+	-	307-34-6	Glycerol carbonate	5	-	-	931-40-8
<i>Ethyl linolenate</i>	6	-	-	1191-41-9	α -Pinene	4	+	R10	80-56-8	Glycerol-1-methyl monoether	4	-	-	623-39-2
<i>Ethyl myristate</i>	5	-	-	124-06-1	β -Pinene	4	+	R10	127-91-3	Glycerol-2-methyl monoether	5	-	R10	761-06-8
<i>Geranyl acetate</i>	5	-	-	105-87-3	Terpinolene	4	+	-	586-62-9	5-(Hydroxymethyl)furfural	4	-	-	67-47-0
<i>Glycerol triacetate</i>	4	-	-	102-76-1	Cluster VII: Amphiprotic					3-Hydroxypropionic acid	5	-	-	503-66-2
Glycerol-1,2,3-tributyl ether	n.f.	-	-	131570-29-1	<i>Benzyl alcohol</i>	4	+	-	100-51-6	3-Methoxy-3-methyl-1-butanol	4	-	-	56539-66-3
Glycerol-1,2,3-triethyl ether	5	+	R10	162614-45-1	1-Butanol	4	+	R10	71-36-3	<i>PolyEthyleneGlycol 200</i>	6	-	-	112-60-7
Glycerol-1,2,3-trimethyl ether	4	+	R10	20637-49-4	Cyclademol	5	-	-	25225-09-6	1,3-Propanediol	4	-	-	504-63-2
Glycerol-1,3-dibutyl ether	4	-	-	2216-77-5	1-Decanol	4	-	-	112-30-1	<i>Propylene glycol</i>	6	+	-	57-55-6
Isoamyl acetate	6	+	R10	123-92-2	Dihydromyrcenol	4	+	-	18479-58-8	Cluster IX: Organic acidic compounds				
Isobutyl acetate	5	+	R11	110-19-0	1,3-Dioxolane-4-methanol	5	-	-	5680-53-7	Acetic acid	4	+	R10	64-19-7
Isopropyl acetate	5	-	R11	108-21-4	<i>Ethanol</i>	5	+	R11	64-17-5	Propionic acid	4	+	-	79-09-4
<i>Isopropyl myristate</i>	6	-	-	110-27-0	Ethylhexyllactate	n.f.	-	-	6283-86-9	Cluster X: Polar structured				
Isosorbide diacetate	5	-	-	64896-70-4	<i>Ethyl lactate</i>	5	+	R10	97-64-3	Water	6	-	-	7732-18-5
Methyl abietate	5	-	-	127-25-3	Geraniol	4	-	-	106-24-1	Ionic liquids				
Methyl acetate	5	+	R11	79-20-9	Glycerol-1,3-diethyl ether	4	-	-	4043-59-8	Choline acetate	n.f.	-	-	14586-35-7
Methyl laurate	4	-	-	111-82-0						3-Butyl-1-methylimidazolium tetrafluoroborate	4	-	-	174501-65-6

*CMR compounds

Dans cette nouvelle classification, l'indice de toxicité est donné selon l'échelle de Hodge et Sterner, indiquant une classe de toxicité en fonction de la DL50, la dose conduisant à la mort de 50 % d'une population (8) (Tableau 27). Les principales classes de toxicité répertoriées dans le tableau des solvants verts (Tableau 26) sont les classes de composés comportant une faible toxicité ou les composés pratiquement non toxiques.

Tableau 27 : Classification des toxicités selon Hodge et Sterner (8).

Classe de toxicité	Caractéristique	DL50 (mg/kg) pour une administration orale unique (chez le rat)
1	Extrêmement toxique	< 1
2	Hautement toxique	1 – 50
3	Toxicité modérée	50 – 500
4	Faible toxicité	500 – 5 000
5	Pratiquement non toxique	5 000 – 15 000
6	Relativement inoffensif	> 15 000

Les COV (Composés Organiques Volatiles) sont également répertoriés car ce sont des composés organiques qui sont susceptibles de se propager facilement dans l'atmosphère. En France, il existe des réglementations concernant les émissions de COV par les installations industrielles et dans la composition des produits de grande consommation (décret n°2006-623 du 29 mai 2006).

Enfin, est prise en compte l'inflammabilité des solvants, qui représente un risque conséquent d'explosion en présence d'une flamme, d'une étincelle ou d'une source de chaleur. Dans le tableau, les phrases de risque recensées sont R10 pour inflammable et R11 pour facilement inflammable. Aucune phrase R12 pour extrêmement inflammable n'est répertoriée ici.

Cette nouvelle liste de solvants constituée par Aubry constitue donc un point de départ unique et de grande valeur pour toute application industrielle pour laquelle des solvants durables sont désirés (9). C'est également sur cette liste que nous avons choisi de nous baser afin de vérifier si les solvants utilisés sur les purifications par CPC présentées précédemment sont répertoriés comme verts et afin de rechercher des solvants alternatifs équivalents aux solvants non-verts.

Dans les chapitres précédents (chapitres 2 et 3), deux systèmes solvants ont été utilisés : un système Arizona composé d'heptane/acétate d'éthyle/méthanol/eau permettant de mettre en avant la preuve de concept du changement d'échelle et un système solvant composé d'heptane/MTBE/éthanol/eau permettant de réaliser la purification du carnosol. Six solvants sont donc présents, tous couramment étudiés et utilisés en CPC mais aussi dans l'industrie en général (3, 10-14). Parmi eux, trois solvants sont répertoriés dans la liste de solvants verts (Tableau 26) : l'acétate d'éthyle, l'éthanol et l'eau ; trois ne sont pas répertoriés : l'heptane, le MTBE et le méthanol. Ces solvants sont présentés ci-après.

- *Solvants non répertoriés dans la liste des 138 solvants verts (2) :*

L'heptane est un alcane couramment utilisé dans l'industrie en tant que solvant pour les colles, encres, caoutchouc et matières plastiques mais aussi en extraction et en tant qu'intermédiaire de synthèse. Ce solvant apolaire est facilement inflammable, très toxique pour les organismes aquatiques, nocif et irritant pour l'homme (15). Il est néanmoins très utilisé en industrie en remplacement de l'hexane, beaucoup plus dangereux pour l'homme et l'environnement (3).

Le MTBE est un éther le plus souvent utilisé en tant qu'additif oxygéné dans les carburants automobiles et secondairement en tant que solvant d'extraction et réactif de copolymérisation (16, 17). Ce solvant inflammable et irritant pour la peau reste également très utilisé en industrie car bien moins toxique que d'autres solvants organiques. Il est en effet actuellement recommandé en industrie en remplacement du dichlorométhane lors d'étapes d'extraction (3).

Le méthanol est un alcool également très présent dans l'industrie (18). Matière première de synthèse, solvant dans l'industrie des peintures, vernis, encre, colorants, adhésifs ou films, agent d'extraction, constituant des carburants, on ne dénombre plus les très nombreuses applications de ce dernier. Malgré sa popularité, le méthanol reste un solvant dangereux pour la santé puisqu'il est très toxique par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion (19). De plus, il est facilement inflammable.

- *Solvants répertoriés dans la liste des 138 solvants verts (2) :*

L'éthanol est un alcool très utilisé dans l'industrie chimique, dans les peintures, vernis, encres, adhésifs, explosifs mais aussi dans l'industrie pharmaceutique, les cosmétiques et parfums. Servant très régulièrement de matière première pour beaucoup d'autres molécules et solvants, c'est aussi un désinfectant et le constituant des boissons alcoolisées consommées par l'homme. Depuis quelques années, l'éthanol suscite également un grand intérêt dans son utilisation en tant que carburant, seul ou en mélange avec l'essence. Comme la plupart des autres solvants, l'éthanol est inflammable (20). S'il existe encore une production industrielle d'éthanol à partir d'éthylène d'origine pétrolière, la majeure partie de l'éthanol est fabriquée par fermentation de matières premières d'origine végétale (plantes sucrières, céréalières et lignocellulosiques) (21). En 2008, la production mondiale d'éthanol d'origine bio-sourcée s'élevait à 65 milliard de litres, dont 40% issus de sucres de canne et de betterave et 60% de céréales (22).

L'acétate d'éthyle est un ester, issu de la réaction de l'éthanol et de l'acide acétique. Ces deux derniers pouvant être d'origine bio-sourcée, l'acétate d'éthyle est parfois répertorié comme agrosolvant (22) ou parfois comme un solvant « eco-friendly », provenant de la valorisation de sous-produits industriels (5). Sa faible dangerosité fait que l'acétate d'éthyle est retrouvé dans de très nombreux domaines et applications : solvant de l'industrie chimique (peinture, vernis, encre, adhésifs, etc.), solvant d'extraction en industrie alimentaire, solvant de process dans l'industrie pharmaceutique, synthèse organique, industrie des arômes et parfums et cosmétiques (dissolvant pour les vernis à ongles). L'acétate d'éthyle est très inflammable et irritant pour les yeux et la peau mais n'est pas nocif ni toxique (23).

L'eau est une molécule très abondante sur Terre puisqu'elle recouvre environ 70% de la surface de la planète, principalement en son état liquide (24). Très polaire, l'utilisation de l'eau en tant que solvant comporte de très nombreux avantages : peu chère, non toxique et non inflammable (24, 25). Le remplacement de solvants organiques par de l'eau permet de considérablement réduire l'émission de COV et la production de CO₂. Dans l'industrie, elle peut être utilisée sous tous ces états, l'eau supercritique étant moins polaire que l'eau sous son état liquide classique. Le principal inconvénient de

l'eau est son haut point d'ébullition (100°C), rendant difficile son élimination lors d'extractions ou de purifications (25).

Les solvants dits verts et non-verts utilisés dans les précédents chapitres ayant été rappelés, nous nous pencherons ici sur la possible substitution des solvants pétroliers heptane, méthanol et MTBE par d'autres solvants plus verts. Ainsi, nous verrons tout d'abord qu'il est possible de remplacer l'heptane par du limonène, un solvant d'origine agro-sourcée, à travers la présentation d'une première publication : « Use of Limonene in Countercurrent Chromatography: A Green Alkane Substitute » (26). S'en suivront alors deux autres articles : « Limonene in Arizona liquid systems used in countercurrent chromatography – I. Physico-chemical properties » (27) et « Limonene in Arizona liquid systems used in countercurrent chromatography – II. Polarity and stationary phase retention » (28), traitant de la création d'un nouveau système solvant Arizona vert et de sa comparaison avec le système Arizona classique que nous avons pu utiliser pour la preuve de concept du scale-up au cours du chapitre 3. Les propriétés physico-chimiques du système solvant Arizona vert seront étudiées puis ce dernier sera testé en CPC à travers la séparation des mêmes molécules que celles utilisées lors de la mise en place de la preuve de concept du changement d'échelle. Enfin, nous terminerons ce chapitre par une tentative de remplacement du système solvant utilisé pour la purification du romarin par le système solvant Arizona vert en remplaçant l'heptane par du limonène et le MTBE par de l'acétate d'éthyle.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel

L'instrument CPC utilisé dans ce chapitre est un FCPC-C25 Kromaton Rousselet-Robatel (Annonay, France), dont le rotor est de même volume et de même design que celui utilisé dans les chapitres 2 et 3 (35 mL, 13 disques et 832 cellules). Seul le bâti, dont le rotor ne peut être changé est différent.

L'appareil hydrodynamique est un instrument Spectrum (Dynamic Extraction, Slough, UK), composé de quatre bobines comportant au total 4 colonnes de volumes 10, 11, 66 et 69 mL pouvant être utilisées seules ou interconnectées. Chaque bobine mesure 60 mm de large et est composée d'environ 33 m de tube de Téflon 1/8" de 1,6 mm de diamètre interne. Dans le cadre des expériences présentées dans ce chapitre, seule la colonne de 66 mL est utilisée, les autres étant remplies d'un mélange éthanol-eau 50/50 pour équilibrage des masses en mouvement.

Dans le cadre de l'étude des solvants verts, le système de pompage des solvants est assuré par une pompe Shimadzu LC8-A et la détection est réalisée à l'aide d'un détecteur UV Shimadzu SPD-6A réglé à 254 nm.

Afin de réaliser la purification du romarin à l'aide de solvants verts, une pompe Armen Spotprep est utilisée, à laquelle est ajouté un détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL) Sedex 85 (Sedere, Alfortville, France). La nébulisation est obtenue par flux d'azote à 3 bars. La température de chauffe du tube d'évaporation est réglée à 100°C (température maximale) afin d'être sûr d'évaporer le limonène dont la température d'ébullition est de 175°C (29).

L'acquisition des données du détecteur Shimadzu et du DEDL est réalisée à l'aide du logiciel Azur (Datalys, St Martin d'Hères, France).

La teneur en eau dans les phases supérieure et inférieure des systèmes solvant est déterminée à l'aide d'un Karl Fisher Metrohm 831. La détermination de la proportion des autres solvants dans chaque phase est réalisée à l'aide d'un appareil de chromatographie en phase gazeuse (GC) Autosystem Perkin Elmer, monté d'une colonne macrobore Supelco Equity 5 de 30 m, de diamètre interne de 0,25 mm contenant un film de polydiméthylsiloxane greffé phényle à 5% de 0,25 µm d'épaisseur. La détection en sortie de GC est réalisée à l'aide d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). Le gaz vecteur utilisé est de l'hélium à une pression de 80 kPa, avec un split de 1/50. La température initiale du four est réglée à 80°C. À la suite de l'injection, cette dernière est maintenue à 80°C durant 3 minutes. Une montée en température est ensuite réalisée, à raison de 20°C/min durant 2 minutes puis la température est maintenue à 120°C durant 2 minutes avant de redescendre à 80°C.

Les différents produits chimiques utilisés dans ce chapitre sont listés dans le Tableau 28.

Tableau 28 : Liste des produits chimiques utilisés

Produits chimiques	CAS	Fournisseur	Pureté
Heptane	142-82-5	Sigma Aldrich VWR	≥ 99 %
(R)-(+)-Limonène	5989-27-5	Sigma Aldrich	≥ 90 %
Méthanol	67-56-1	Sigma Aldrich	≥ 99,9 %
Acétate d'éthyle	141-78-6	Sigma Aldrich	≥ 99,7 %
Ethanol	64-17-5	Sigma Aldrich	≥ 96 %
Diéthylphthalate	84-66-2	Sigma Aldrich	≥ 99,5 %
Méthyl-parabène	99-76-3	Sigma Aldrich	≥ 99,0 %
Benzène	73-43-2	Sigma Aldrich	≥ 99,9 %
Toluène	108-88-3	Sigma Aldrich	≥ 99,9 %
New coccine red	2611-82-7	Sigma Aldrich	75 %
Aspirine	50-78-2	Sigma Aldrich	≥ 99,0 %
Coumarine	91-64-5	Sigma Aldrich	≥ 99 %
Extrait sec romarin	-	Cooper industries	-
Carnosol	5957-80-2	Phytolab	≥ 90 %

2.2. Préparation des échantillons

Afin de calculer la valeur des coefficients de partage du benzène et du toluène dans les systèmes solvant heptane et/ou limonène/méthanol/eau, une solution composée de 5,7 mg/mL de benzène et 4,3 mg/mL de toluène est réalisée par dilution des solutions dans la phase mobile du système biphasique.

La séparation et la mesure du coefficient de partage du méthylparabène et du diéthylphthalate dans les systèmes solvants heptane et/ou limonène/méthanol/eau est réalisée à l'aide d'une solution de méthylparabène à 0,4 mg/mL et de diéthylphthalate à 9 mg/mL dissous ou dilué dans la phase mobile du système biphasique.

La préparation de la solution composée de solutés Guess (new coccine red, aspirine et coumarine) est réalisée par pesée et dissolution des trois composés dans la phase mobile de chaque système solvant utilisé à raison de 0,6 mg/mL de new coccine red, 5,7 mg/mL d'aspirine et 1,2 mg/mL de coumarine.

La préparation de l'extrait de romarin à purifier est réalisée de la même manière que dans le chapitre 2, à savoir une solution à 500 mg d'extrait éthanolique de romarin par mL de système solvant suivi d'une solubilisation aux ultrasons de 10 minutes et une centrifugation à 5000 rpm durant 3 minutes afin de forcer le dépôt des composés non solubles au fond du flacon.

3. Résultats et discussion

3.1. Le limonène : une alternative à l'heptane, un solvant pétrolier largement utilisé en CPC

3.1.1. Présentation de l'article

Cette section est présentée sous la forme d'une publication présentant la possible substitution de l'heptane, un solvant d'origine pétrolière très souvent utilisé en CPC, par du limonène, un solvant dit « vert » de par son origine bio-sourcée. Cette publication nommée « Use of Limonene in Countercurrent Chromatography: A Green Alkane Substitute » (26) est parue en 2013 dans la revue *Analytical Chemistry*. Elle a été citée 13 fois au 15 septembre 2015.

Le limonène est un agrosolvant extrait des épluchures d'agrumes utilisées dans la fabrication de jus de fruits (30). Avec une production de 68 millions de tonnes d'oranges en 2012, ces déchets de l'industrie agroalimentaire représentent donc une source importante de biomasse pour la production de limonène mais aussi d'éthanol (22, 31). Le limonène est actuellement très utilisé dans l'industrie en tant que solvant de dégraissage des métaux, nettoyant dans l'industrie électronique et imprimerie, solvant dans les peintures, en synthèse ou comme agent mouillant. Le limonène est également très présent dans l'industrie des cosmétiques et parfums. Comme tous les autres solvants présentés dans ce chapitre, le limonène est inflammable. Non toxique pour l'homme, il est cependant irritant et sensibilisant pour la peau et très toxique pour les organismes aquatiques (29). Le limonène est recensé dans la liste des 138 solvants verts établie par Aubry (2) (Tableau 26 en début de chapitre).

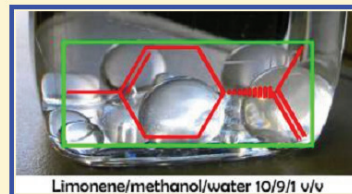
Afin d'évaluer l'éventuel remplacement de l'heptane par du limonène, les propriétés physico-chimiques des deux solvants sont comparées dans l'article présenté ci-après. Un système solvant biphasique composé d'heptane, de méthanol et d'eau en proportions 10/9/1 (v/v) est ensuite sélectionné et confronté à son système homologue en remplaçant l'heptane par du limonène. En premier lieu, la composition des phases est étudiée à travers le tracé et la comparaison des diagrammes ternaires des deux systèmes solvant. Un test de ces deux systèmes est ensuite réalisé en conditions réelles sur des appareils hydrodynamique et hydrostatique en vue de vérifier et comparer leur tenue de phase stationnaire en fonction du débit appliqué et de mesurer l'évolution de la valeur du coefficient de partage de 4 solutés test : le méthylparabène, le diéthylphtalate, le benzène et le toluène. La séparation du méthylparabène et du diéthylphtalate est également réalisée sur système hydrostatique. Des systèmes solvants intermédiaires combinant l'heptane et le limonène au méthanol et à l'eau sont également testés afin d'évaluer l'évolution de leur comportement en fonction de la proportion de limonène.

Use of Limonene in Countercurrent Chromatography: A Green Alkane Substitute

Karine Faure, Elodie Bouju, Pauline Suchet, and Alain Berthod*

Institut des Sciences Analytiques, CNRS, Université de Lyon, 5 rue de la Doua, 69100 Villeurbanne, France

ABSTRACT: Counter-current chromatography (CCC) is a preparative separation technique working with the two liquid phases of a biphasic liquid system. One phase is used as the mobile phase when the other, the stationary phase, is held in place by centrifugal fields. Limonene is a biorenewable cycloterpene solvent coming from orange peel waste. It was evaluated as a possible substitute for heptane in CCC separations. The limonene/methanol/water and heptane/methanol/water phase diagrams are very similar at room temperature. The double bonds of the limonene molecule allows for possible π - π interactions with solutes rendering limonene slightly more polar than heptane giving small differences in solute partition coefficients in the two systems. The 24% higher limonene density is a difference with heptane that has major consequences in CCC. The polar and apolar phases of the limonene/methanol/water 10/9/1 v/v have -0.025 g/cm³ density difference (lower limonene phase) compared to $+0.132$ g/cm³ with heptane (upper heptane phase). This precludes the use of this limonene system with hydrodynamic CCC columns that need significant density difference to retain a liquid stationary phase. It is an advantage with hydrostatic CCC columns because density difference is related to the working pressure drop: limonene allows one to work with high centrifugal fields and moderate pressure drop. Limonene has the capability to be a “green” alternative to petroleum-based solvents in CCC applications.

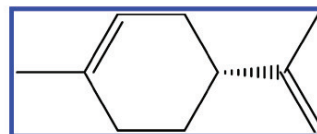


Counter-current chromatography (CCC) is a liquid–liquid preparative separation technique working with a support-free liquid stationary phase.^{1–3} Biphasic liquid systems are used. The liquid stationary phase can be any one of the two phases of the biphasic liquid system. Centrifugal fields are used to maintain the liquid stationary phase inside the CCC instrument, which can be called a “column” by analogy with other chromatographic techniques. The CCC technique has serious potential as a green technology for purification of chemicals since it has a higher loading capacity compared to a classical solid phase preparative liquid chromatography (LC) column of similar volume. A study comparing both techniques demonstrated that, to purify the same mass of the spinetoram insecticide, the CCC solvent use was three times lower than the solvent volume needed with classical prep LC.⁴ Parameters to improve solvent saving and productivity were investigated.⁵ Solvent recycling capability was also demonstrated.⁶ It appears that CCC is a liquid–liquid purification technique with underestimated potential in the present “green” approach trend in chemical processes.^{4–6}

The ecological impact of a chemical purification can be reduced by acting on the process itself, reducing the solvent volume needed. It can also be reduced acting on the nature of the solvent.⁷ Looking for a renewable solvent rather than a petroleum-based one, limonene was selected as a possible candidate to replace alkanes, and especially heptane, in CCC purifications.

Limonene (Scheme 1) is a cyclic monoterpene of molecular formula C₁₀H₁₆ making, as the D-isomer (structure), at least 90% of orange peel oil.⁸ With a world production passing 50 000 tons/year (about 60 000 m³ or 16 millions gallons),

Scheme 1. Limonene Structure



essentially coming from orange and citrus stripper oil, limonene is an easily available and renewable solvent. It found uses in the flavor and fragrance industries, in the manufacturing of polymers and adhesives and, as a solvent, in metal degreasing or paint thinner.⁹ Limonene is listed as a GRAS solvent (generally recognized as safe) by the Food and Drug Administration (FDA).¹⁰ FDA authorized its use as a food additive or flavoring agent in household items demonstrating its innocuousness. The Environmental Protection Agency (EPA) did not require any tolerance limit for limonene use in pesticide or insect repellent formulations.¹⁰ Due to these facts and properties, we decided to check the limonene ability to replace heptane as a “greener” solvent in CCC separations. Limonene was first proposed by Friesen as a possible sustainable substitute to heptane.¹¹ As a chiral compound, *d*-limonene was also evaluated as a selector for enantiomer separations by CCC.¹² This work compares a simple limonene-based biphasic solvent system used in the two types of CCC columns:

Received: January 28, 2013

Accepted: April 1, 2013

Published: April 1, 2013

Table 1. Physico-Chemical Properties of Solvents

parameter	unit	heptane	limonene	methanol
m.w.	Dalton	100	136	32
density	g/cm ³	0.679	0.841	0.791
log P_{ow} ^a		4.50	4.58	-0.74
water solubility ^b		0.00024%	0.08%	miscible
methanol solubility ^b		29.7%	32%	miscible
boiling point	°C	98.4	178	64.6
viscosity 25 °C	mPa·s or cP	0.389	0.923	0.544
UV cut off wavelength	nm	200	250	205
Oil/Methanol/Water 10/9/1 v/v				
density difference ^c	g/cm ³	+0.132 (heptane upper phase)	-0.025 (limonene lower phase)	
methanol in oil phase	% v/v	0.2 ^d	7	—
water in oil phase	% v/v	0.0 ^d	0.04	
oil in polar phase	% v/v	5.2 ^d	6.7	
water in polar phase	% v/v	9.6 ^d	6.9	—

^aOctanol/water partition coefficient. ^bSolvent solubility in water or in methanol at 25 °C expressed in weight percentage. Data from Lide, D.R. *Handbook of Chemistry and Physics*, 89th ed.; CRC Press, 2009. ^cDifference of density between the aqueous phase and the oil (heptane or limonene) phase of the system oil/methanol/water 10/9/1 v/v. ^dData from ref 2, room temperature.

hydrodynamic coil-based CCC and hydrostatic rotor-based centrifugal partition CCC.¹⁻³

■ EXPERIMENTAL SECTION

Chemicals. (R)-(+)-Limonene (*d*-limonene, CAS 94266-47-4) was obtained from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) as the technical grade 90% pure product. The 10% impurity is mainly the (S)-(-) or *l*-limonene enantiomer. Limonene is chemically stable when kept in closed dark colored bottles since it can slowly form oxides when exposed to oxygen and light.¹⁰ It was used as received. Heptane was the analytical grade product of VWR (Fontenay sous bois, France). Methanol, diethylphthalate, and methyl paraben were products of Sigma-Aldrich. Water was laboratory distilled in a glass boiler.

Instrumentation. The hydrodynamic CCC instrument was a double coil Model Spectrum by Dynamic Extraction (Slough, UK). The two coils of 66 mL could be used independently or connected in series making either a 68 mL (one coil used) or a 136 mL (two coils serially connected) CCC column. Each coil was made winding 33 m of 1.6 mm i.d. 3.2 mm o.d. Teflon tubing in 9 layers, the most internal layer having a β_r ratio (coil radius, r , over rotor revolution radius, R)² of 0.52 and for the external layer $\beta_r = 0.86$ with a rotor revolution radius of 8.5 cm. The rotor could cruise at 2000 rpm generating a maximum centrifugal field of ~2600 G with G being the earth gravitational field (9.81 m·s⁻²).

The hydrostatic instrument was a recently introduced 35 mL column model FCPC-C (or R2D2 for its look) by Kromaton Rousselet-Robatel (Annonay, France).¹³ The hydrostatic CCC design is made with a pattern of cells interconnected by ducts and dug in a stainless steel disk. The cell design was called a "twin" cell: a restriction in the middle of the canal creates two superimposed chambers. The rotor was made by associating 13 disks each containing 64 "twin" cells being a total of 832 twin cells. The total cell volume was about 25 mL with 8 mL or 24% of the column volume corresponding to the connecting ducts. The maximum theoretical liquid stationary phase retention factor $S_f (= V_s/V_c)$ is 76% since the 24% of connecting duct volume can only contain mobile phase. The maximum rotor rotation is 3000 rpm generating a maximum centrifugal field of ~1500 G. Two rotating seals are needed at the rotor entrance

and exit (also called column top or "head" and column bottom or "tail"). They can withstand a maximum pressure of 70 bar (7 MPa or 1000 psi).

The other equipment included a Shimadzu SDP6A UV detector, Rheodyne injection valves with 2 mL injection loop, a Shimadzu LC8 preparative pump, and a Shimadzu LC10AS pump. Analogical detector signals were processed using the Azur software (Datalys, Grenoble, France). Phase densities were simply determined by weighing a 25 mL graduated vial filled by the desired phase.

■ RESULTS AND DISCUSSION

Biphasic System Limonene/Methanol/Water. Table 1 compares the physicochemical properties of (R)-(+)-limonene (*d*-limonene) with heptane, methanol, and water. Heptane and limonene are very close in terms of polarity and solvent capability with polar methanol and water. The ternary phase diagrams of the heptane and limonene/methanol/water are shown in Figure 1. It is acknowledged that these three-solvent systems are not the best systems for practical CCC separations: the polarity difference between their two immiscible phases is too strong; this explains why no real sample separation will be shown in this work. Ethyl acetate must be added to form four-solvent biphasic systems called Arizona systems¹⁴ or HEMWat (for heptane/ethyl acetate/methanol/water) systems¹⁵ for useful separations of moderately hydrophobic samples by CCC. The four-solvent limonene-based systems will be studied in further works. The simpler three-solvent systems allow for first evaluation of limonene capability in CCC.

There is a significant difference between the limonene and heptane densities. The 24% higher density of limonene (Table 1) makes it the denser phase in the biphasic liquid system limonene/methanol/water 10/9/1 v/v. The heptane phase is the lighter or upper phase of the similar heptane/methanol/water 10/9/1 v/v biphasic system. This is critical in CCC operation where the mobile phase flowing direction depends on the mobile-stationary phase density difference. Hydrostatic or hydrodynamic CCC columns are oriented: they have a top opening, also called head, and a bottom opening, also called tail.¹⁻³ The selected biphasic liquid system placed in a cylinder will always arrange its two phases in a lower denser and upper lighter phase because it is in the earth gravitational field. In a

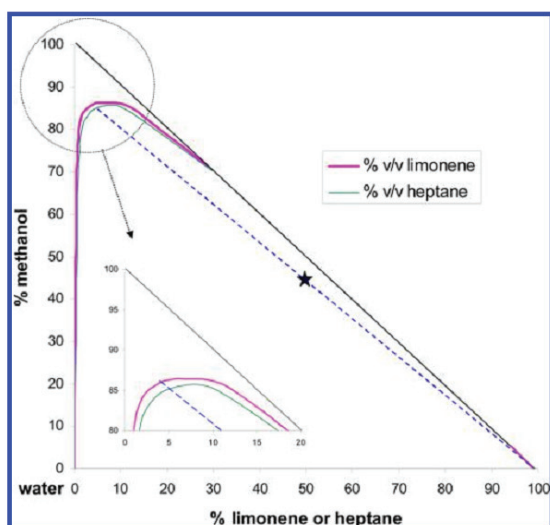


Figure 1. Heptane or limonene/methanol/water ternary volume phase diagrams at room temperature. The inset triangle is an enlargement of the solubility curves near the methanol apex. Note the 7% v/v methanol solubility in limonene and not in heptane. The star locates the 10/9/1 v/v composition with its dashed tie-line; see Table 1. Data for the heptane/methanol/water phase diagram taken from Tables 7–12 of ref 2.

rotating CCC column, the centrifugal field arranges the two phases in a similar way: the denser phase tends to locate at the column tail (or bottom) and the upper phase accumulates at the column head (or top). If the mobile phase is the lower phase, it must be flown in the descending or head-to-tail direction so that it crosses the lighter phase accumulated at the column head. If the mobile phase is the lighter upper phase, it must be flown in the ascending or tail-to-head direction.^{1–3}

In the case of the heptane/methanol/water system, the lighter and apolar heptane mobile phase will be flown in the

ascending or tail-to-head direction (normal phase mode). It is the opposite when limonene is the mobile phase in the same normal phase mode: limonene must be flown in the descending head-to-tail direction because it is denser than the methanolic polar stationary phase. The density difference between the limonene heavier phase and the methanol/water upper phase is only 0.025 g/cm³ at 22 °C (Table 2). Figure 2 shows the peculiar spherical meniscus observed between the two phases of the 10/9/1 v/v limonene/methanol/water system at room temperature. The density difference is so small than the limonene denser phase forms spheres aggregating very slowly (hours) one with the others.

Hydrodynamic CCC Instruments. It is difficult to maintain a liquid phase steady, without any solid support, when an immiscible liquid mobile phase is passed through it. This is the main task of the CCC instrument. Most of these instruments work with centrifugal fields hence rotating pieces. The hydrodynamic CCC design was proposed by Ito that described a combined rotation of a coiled spool spinning around a central axis in a planetary way.¹⁶ The planetary motion of the spools creates a variable centrifugal field. The field is intense when the rotor field and the spool field add up both spinning in the same direction: the two liquid phases separate by decantation. When the spool and the rotor fields have opposite directions inside the rotor, the resulting weaker centrifugal field has an opposite direction causing a phase mingling close to the rotor center.

The succession of phase mixing and decantation is linked to the phase density difference. It was demonstrated that a hydrodynamic CCC column was working as a “constant pressure-drop” system: the flowing cross-section seen by the mobile phase increases as the flow rate increases because less stationary phase is retained by the hydrostatic column.¹⁷ The dimensionless stationary phase retention factor, S_f , is used to study the liquid stationary phase retention by a CCC column. S_f is defined as the volume ratio:

$$S_f = V_s/V_c \quad (1)$$

Table 2. Stationary Phase Retention (S_f) Data for Hydrodynamic and Hydrostatic CCC Columns and Solute Partition Coefficients^a

limonene % v/v	Δd^b (g/mL)	slope B^c (eqs 2 or 4)	intercept A^c (eqs 2 or 4)	flow rate giving $S_f = 50\%$ (mL/min)	pressure drop at 1 mL/min (MPa)	K^d diethylphthalate	K^d benzene	K^d toluene
Hydrodynamic Spectrum CCC 68 mL Column, Rotor Rotation 1200 rpm, Figure 3 and Eq 2								
						$K_{ow} = 260$	$K_{ow} = 135$	$K_{ow} = 490$
100	−0.025	(−1.3)	(0.96)	0.1	0.25	0.65	2.4	4.2
70	0.025	−0.55	0.83	0.4	0.30	0.54	2.3	3.8
50	0.053	−0.34	0.96	1.8	0.30	0.46	2.2	3.6
25	0.101	−0.115	0.95	15	0.35	0.37	2.1	3.3
0	0.132	−0.11	0.96	17.5	0.40	0.27	2.0	3.0
Hydrostatic Kromaton FCPC-C 35 mL Column, Rotor Rotation 2500 rpm, Eq 4								
100	−0.025	−0.083	0.69	2.2	0.80	0.65	2.4	4.2
70	0.025	−0.050	0.70	4.0	1.30	0.54	2.3	3.8
50	0.053	−0.035	0.70	5.7	2.10	0.46	2.2	3.6
0	0.132	−0.021	0.69	(10) ^e	7.00	0.27	2.0	3.0

^aBiphasic liquid system: oil/methanol/water 10/9/1 with oil being mixtures of limonene and heptane. ^b Δd : density difference between the polar phase and the oil phase; $\Delta d = -0.159 \cdot (\text{limonene } \%) + 0.135$. The mobile phase is the polar methanolic phase in the descending (head-to-tail) direction except with the 100% limonene denser stationary phase. ^cThe regression coefficients were between 0.981 (70% limonene, Spectrum column) and 0.999 (70% limonene, Kromaton column). ^dCoefficients are the distribution coefficients expressed as [solute in oil phase] over [solute in polar phase]. Octanol/water, K_{ow} coefficients are listed. K for *p*-methylhydroxybenzoate was about 0.005 or lower ($K_{ow} = 40$). ^eTheoretical flow rate, not tested experimentally due to excessive pressure drop.



Figure 2. Peculiar bubble form of the limonene lower phase in equilibrium with the polar phase of the system limonene/methanol/water 10/9/1% v/v at room temperature (star in Figure 1 phase diagram).

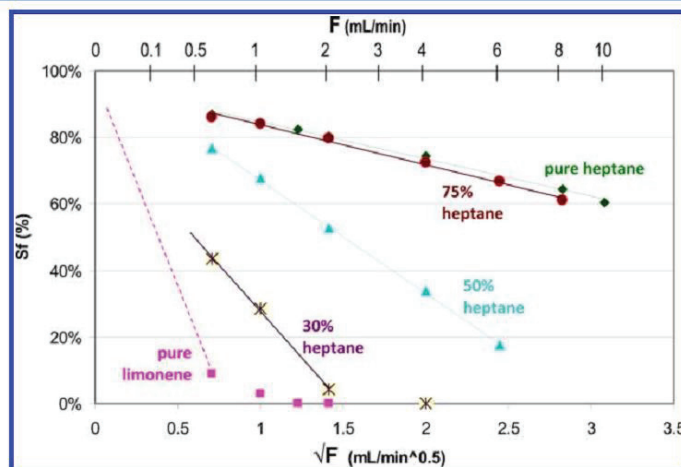


Figure 3. Apolar liquid stationary phase retention (S_f) by a hydrodynamic CCC column as a function of the square root of the polar mobile phase flow rate. Hydrodynamic column: spectrum 68 mL, rotor rotation 1200 rpm, liquid system oil/methanol/water 10/9/1 v/v with oil being limonene, heptane or a heptane/limonene mixture as indicated in the figure. The dashed line was extrapolated from the 0.5 mL/min S_f results with the pure limonene stationary phase and methanol/water mobile phase in the ascending (tail-to-head) direction (data in parentheses in Table 2). All other experiments were done in the descending (head-to-tail) polar mobile phase flowing direction.

in which the subscripts S and C refer to the stationary and CCC column volumes, respectively. For hydrodynamic CCC column only, S_f was demonstrated to be linearly decreasing with the square root of the mobile phase flow rate.^{17,18}

$$S_f = A - B\sqrt{F} \quad (2)$$

Wood demonstrated that the constant A corresponded to the CCC column full of stationary phase ($S_f = 100\%$) minus the

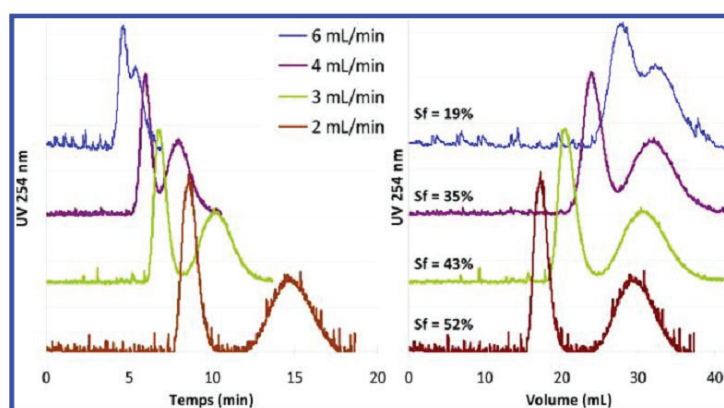


Figure 4. Separation of methylparahydroxybenzoate (first peak, $K = 0.005$) and diethylphthalate (second peak, $K = 0.65$) with a 35 mL hydrostatic CCC column (CPC). Rotor rotation: 2500 rpm; liquid system: limonene/methanol/water 10/9/1 v/v; stationary phase: limonene; mobile phase: polar phase in the ascending direction. The limonene S_f values are given on the chromatograms. Left chromatograms: time scale; right chromatograms: volume scale.

connecting dead volume, V_d , ratio (V_d/V_C).¹⁷ The gradient B is linked to the experimental conditions as:^{17,19}

$$B = \frac{800}{\pi d_C^2} \sqrt{\frac{\mu_M}{\omega^2 R (\rho_L - \rho_U)}} \quad (3)$$

where d_C is the internal diameter of the coiled tube, μ_M is the mobile phase viscosity, ω is the rotor rotation speed, R is the rotor radius or distance between the spool axis and central axis, and ρ is the liquid phase density (U and L for respectively, upper and lower phase).

A weak B gradient is desirable so that a significant amount of stationary phase remains in the hydrodynamic CCC column at elevated flow rates. Equation 3 shows that B is minimized when a high rotor rotation speed is associated with a low mobile phase viscosity and a large density difference between the two liquid phases. Figure 3 shows the stationary phase retention (S_f) variation plotted versus the square root of the flow rate for the two 10/9/1 v/v biphasic liquid systems: heptane/methanol/water and limonene/methanol/water and mixing limonene and heptane as the apolar phase to modulate density differences. Straight lines were obtained except for the 100% limonene system that produced very low limonene retention: at 0.5 mL/min of the methanol phase in the ascending (head-to-tail) direction and 1200 rpm, less than 10% limonene (6.5 mL) remained in the 68 mL hydrodynamic column. Practically no limonene stationary phase could be retained at flow rate higher than 0.5 mL/min (Figure 3). Very low mobile phase flow rates could not be tested due to the long run times associated with temperature changes inside the rotor. The B gradient listed in parentheses in Table 2 (dotted line in Figure 3) was estimated using the single S_f retention obtained at 0.5 mL/min and assuming an A value of 0.96 or 96%. This poor limonene retention by the hydrodynamic CCC column is due to the very low density difference between limonene and the methanol-rich mobile phase. It precludes the practical use of limonene in hydrodynamic CCC columns with the liquid system limonene/methanol/water 10/9/1 and confirm the preliminary results available.¹¹

Since heptane is well retained by the hydrodynamic CCC column at 1200 rpm due to the density difference between the two liquid phases, heptane and limonene were mixed to

modulate the apolar phase density. Figure 3 shows the stationary phase retentions obtained with different heptane/limonene compositions. Table 2 lists the corresponding density differences and slopes, intercepts, and regression coefficients (eq 2). The flow rate at which 50% of the apolar phase is still retained by the CCC column is a good indication of the liquid system practical use. This S_f 50% flow rate was calculated using the Figure 3 regression lines. The 68 mL hydrodynamic column is swept in 4 min at 17.5 mL/min (heptane 100%) with an acceptable S_f of 50%. In these conditions, most chromatograms will be completed in less than 20 min (five column volumes). The picture is completely different with the limonene system. One column volume would need more than 11 h at 0.1 mL/min with the needed 50% pure limonene remaining in the hydrodynamic CCC column. This experimental duration is not reasonable. Using mixtures of limonene and heptane, it is possible to improve S_f at practical flow rates. One column volume would need 38 min at 1.8 mL/min with $S_f = 50\%$ of the 50/50 limonene/heptane composition. Higher flow rates would give S_f values lower than 50% associated with a poor resolution capability of the CCC column.³ The oil composition: limonene 70%/heptane 30% was selected because it gave the same density difference as pure limonene (Table 2) but with the oil phase being the upper phase. The polar methanolic mobile phase is flown in the descending direction. Slightly better apolar phase retention was obtained with $S_f = 28\%$ at 1 mL/min (Figure 3 and Table 2). Viscosity differences may explain this somewhat better phase retention in the descending mode.

Recently, a new type of hydrodynamic CCC columns has been introduced: the spiral disk assembly.^{20,21} This improved design demonstrated enhanced retention of the stationary phase with polar butanol/water biphasic systems compared to the classical hydrodynamic design and to hydrostatic CCC columns. We could not test the spiral disk CCC assembly without having the equipment. However, we think that the stationary phase retention of the spiral disk is based on the hydrodynamic design needing some phase density difference to work. The barricaded spiral disk design does contain geometrical "grips" for the stationary phase that could produce limonene retention.^{20,21}

Hydrostatic CCC Instruments. The hydrostatic CCC columns, also called centrifugal partition chromatographs (CPC), are simple centrifuges with a single rotation axis. The centrifuge rotor contains a stack of disks with a pattern of engraved chambers interconnected by ducts.²² Each chamber can physically hold the liquid stationary phase subjected to a constant centrifugal field. CPCs can be considered like modern Craig machines with connected test tubes that can work at a much higher mobile phase flow rate since the generated centrifugal field of a CPC is orders of magnitude higher than the G gravitational field of the Craig machine.²²

The liquid stationary phase retention, S_f , in hydrostatic CCC columns (CPC) was studied by Foucault who established experimentally:²²

$$S_f = A - B'F \quad (4)$$

where A is 100% minus the total connecting duct volume and B' is the gradient of the linear decrease of stationary phase retention with increasing flow rate. The connecting ducts contain only mobile phase so the maximum S_f value for a hydrostatic CCC column is necessarily significantly lower than 100% compared to a hydrodynamic column.²

Table 2 lists the regression parameters for the limonene stationary phase retention with the polar methanol-rich upper phase in the ascending (tail-to-head) flowing direction. The limonene phase is retained with $S_f = 52\%$ at 2 mL/min ascending flow rate of the polar mobile phase. The 35 mL column volume is swept in about 17 min. This is much better than the limonene retention by the hydrodynamic column (no retention at 2 mL/min, Figure 3). Figure 4 shows the chromatograms of two test solutes at different flow rates. It illustrates a unique feature of the CCC technique: the same CCC column used with the same liquid system and the same sample can produce different chromatograms depending on the volume of liquid stationary phase retained by the column.^{1–3} Since the amount of retained limonene decreases at higher polar mobile phase flow rates, the resolution between compounds decreases. With the 6 mL/min flow rate, the two compounds are separated with a low 0.3 resolution factor in less than 6 min (Figure 4). The low 19% S_f does not allow for acceptable resolution. At 3 mL/min, the S_f ratio is 43% and high enough to allow for a baseline separation of the two test solutes in 12 min (Figure 4). The right part of Figure 4 shows the chromatograms with a volume scale enhancing the dramatic resolution decrease due to the reduced volume of limonene stationary phase at high flow rate.

Pressure drop can be a problem with hydrostatic CCC columns whose rotating seals cannot withstand pressures higher than 0.8–1 MPa (80–100 bar or 1100–1400 psi). Phase density difference, $\Delta\rho$, is a critical parameter of the hydrostatic pressure drop, ΔP :¹⁹

$$\Delta P = C\Delta\rho\omega^2 S_f + D\mu_M F \quad (5)$$

in which C and D are instrumental constants. The first term of eq 5 is the hydrostatic term, most often the dominant term with hydrostatic CCC columns; the second term is the Darcy law hydrodynamic term. Table 2 lists the experimental pressure drops read for a 1 mL/min flow rate at 1200 and 2500 rpm for the hydrodynamic and hydrostatic CCC columns, respectively. The 0.8 MPa pressure drop (8 bar or 115 psi) observed at 2500 rpm is very moderate at this high rotor rotation due to the low limonene – (methanol/water) density difference (Table 2). The same experimental conditions (2500 rpm and 1 mL/min

descending mode) with heptane as the stationary phase gave a 7 MPa pressure drop (70 bar or 1000 psi; Table 2). The low density difference experimented with limonene was a big problem with hydrodynamic CCC columns, simply precluding their use. This low density difference is actually an advantage with hydrostatic columns since it generates a reduced pressure drop. It allows one to use hydrostatic columns with high rotor rotations, hence strong centrifugal fields.

Solute Distribution Coefficients. Solute distribution (or partition) coefficients depend only on the biphasic liquid system composition not on the CCC column type. However, the solute peak position expressed as retention volume, V_r , is directly related to the solute distribution coefficient, K , by the simple relation:^{1–3}

$$V_r = V_M + KV_S \quad (6)$$

The V_r volumes depend on the CCC columns that have different volumes and retention ability for the stationary phase. Figure 4 shows chromatograms obtained with the same liquid system, hence the same K values but different S_f values. Table 2 lists the K coefficients obtained with the oil/methanol/water 10/9/1 v/v biphasic liquid systems when the oil phase was made of limonene/heptane mixtures. By analogy with the octanol/water partition coefficient, the oil/polar aqueous phase coefficients are listed in Table 2. It is important to note that the CCC technique gives the K distribution coefficient, not $\log K$, as returned by most estimation softwares.

The first observation is that the limonene K coefficients have the same order of magnitude as the heptane ones. When compared using the usual log scale, the $\log K$ values of diethylphthalate, benzene, and toluene are, respectively -0.19 , 0.39 , and 0.62 with limonene and -0.57 , 0.29 , and 0.47 with heptane.

A linear decrease of K is observed when more heptane is added to the apolar oil phase of the oil/methanol/water 10/9/1 v/v biphasic liquid system signing an ideal limonene–heptane mixing. The higher K coefficients in the limonene phase compared to the heptane phase indicates that the three tested solutes have a slightly higher affinity for the limonene phase than for the heptane phase. The sp^2 electrons in the limonene double bonds likely interact with the π -electrons of the solutes aromatic rings. The ideal limonene–heptane solution and the very moderate differences in partitioning of the tested solutes led us to think that, from a chemical point of view, the solvent properties of limonene are similar to those of heptane.

CONCLUSION

Limonene is a biorenewable solvent that has similar polarity and solvating properties compared to heptane. Its low toxicity and “green” source from orange peel waste make it a fine sustainable candidate to replace heptane in many chemical processes. However, it was established that the 24% higher density of limonene, compared to heptane, was a big concern in CCC. Density difference is an essential parameter in CCC. It must be as large as possible with hydrodynamic CCC columns so that they can retain an acceptable amount of liquid stationary phase. It is desirable to have a small density difference with hydrostatic CCC columns (CPC) where this parameter is responsible for the working pressure drop. The limonene/methanol/water system had a very small density difference between its two phases precluding its use with hydrodynamic CCC columns: no stationary phase could be retained at effective mobile phase flow rates. With hydrostatic

CCC columns, this low density difference of the limonene system was an advantage allowing one to run the CPC columns at high rotor rotation speed without excessive pressure for the rotating seals. It must be mentioned that, when enough liquid stationary phase can be retained, hydrodynamic CCC columns always have a better chromatographic efficiency than hydrostatic CPCs (thinner peaks). However, hydrostatic CPCs have fewer problems to retain a liquid stationary phase, and no stationary phase means no chromatographic separations. This study shows that the quest for “green” chemical solvent replacement must consider all properties of the candidate. Limonene is a possible substitute to heptane in term of solvent properties. When dealing with CCC purifications, its density is a critical parameter.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel.: +33 437 423 553. E-mail: berthod@univ-lyon1.fr.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

A.B. and K.F. thank the French Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, UMR5280 ISA) for continuous support. E.B. thanks the French Ministère de la Recherche for a CIFRE PhD grant. P.S. thanks University of Lyon and the Kromaton-Rousselet Robatel company for a one-year joint industrial grant. Kromaton-Rousselet Robatel is also thanked for the gracious loan of the FCPC-C small hydrostatic CCC apparatus.

REFERENCES

- (1) Berthod, A., Ed. *Countercurrent Chromatography. The Support-Free Liquid Stationary Phase*; Comprehensive Analytical Chemistry; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2002; Vol. XXXVIII.
- (2) Conway, W. D. *Countercurrent Chromatography, Apparatus, Theory & Applications*; VCH Publishers: Weinheim, Germany, 1990.
- (3) Ito, Y.; Conway, W. D., Eds. *High Speed Countercurrent Chromatography; Chemical Analysis*; Wiley: New York, 1996; Vol. 132.
- (4) DeAmicis, C.; Edwards, N. A.; Giles, M. B.; Harris, G. H.; Hewitson, P.; Janaway, L.; Ignatova, S. *J. Chromatogr., A* **2011**, 1218, 6122–6127.
- (5) Zhang, M.; Ignatova, S.; Hu, P.; Liang, Q.; Wang, Y.; Luo, G.; Sutherland, I. A. *J. Chromatogr., A* **2011**, 1218, 6031–6037.
- (6) Garrard, I. J.; Janaway, L.; Fisher, D. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2007**, 30, 151–163.
- (7) Curzons, A. D.; Constable, D. J. C.; Mortimer, D. N.; Cunningham, V. L. *Green Chem.* **2001**, 3, 1–6.
- (8) Vora, J. D.; Matthews, R. F.; Crandall, P. G.; Cook, R. *J. Food Sci.* **1983**, 36, 539–542.
- (9) Thomas, A. F.; Bessiere, Y. *Nat. Prod. Rep.* **1989**, 6, 291–309.
- (10) United States Environmental Protection Agency. Registration Eligibility Decision, *Limonene RED Facts*; report EPA-738-F-94-030; USEPA: Washington, DC, Sept. 1994.
- (11) Friesen, J. B.; Thompson, N. D.; Dudek, J. J.; Moore, K. I.; Liberi, P. S.; Pauli, G. F. Communication presented at the 6th International Conference on Countercurrent Chromatography, CCC2010, Lyon, France, July 2010.
- (12) Nahimana, M.; Novell, A.; Minguillón, C. Poster presented at the 24th ISCD Symposium, Chirality 2011, Liverpool, UK, July 2011.
- (13) Faure, K.; Mekaoui, N.; Meucci, J.; Berthod, A. *LC/GC North Am.* **2013**, 31 (2), 132–143.
- (14) Berthod, A.; Hassoun, M.; Ruiz-Angel, M. J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, 383, 327–340.
- (15) Friesen, J. B.; Pauli, G. F. *Anal. Chem.* **2007**, 79, 2320–2324.
- (16) Ito, Y.; Weinstein, M.; Aoki, I.; Harada, R.; Kimura, E.; Nunogaki, K. *Nature* **1966**, 212, 985–987.
- (17) Wood, P. L.; Hawes, D.; Janaway, L.; Sutherland, I. A. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2003**, 26, 1373–1396.
- (18) Du, Q.; Wu, C.; Qian, G.; Wu, P.; Ito, Y. *J. Chromatogr., A* **1999**, 835, 231–235.
- (19) Berthod, A. *Adv. Chromatogr.* **2008**, 47, 322–352.
- (20) Ito, Y. *Chem. Eng. Process.: Process Intens.* **2010**, 49, 782–792.
- (21) Knight, M.; Finn, T. M. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2009**, 32, 2669–2685.
- (22) Foucault, A. P., Ed. *Centrifugal Partition Chromatography, Chromatogr. Sci. Ser.*; Dekker: New York, 1995; Vol. 68.

3.1.2. Conclusion

Cette publication a permis de montrer que l'heptane et le limonène présentent certaines différences mais aussi des similarités rendant possible la substitution de l'un par l'autre. Après avoir réalisé la comparaison des propriétés physico-chimiques des deux solvants, ces derniers ont pu être confrontés au sein d'un système composé d'heptane et/ou de limonène, de méthanol et d'eau en proportions 10/9/1 (v/v).

En termes de polarités, l'heptane et le limonène s'avèrent très similaires puisque leur $\log P_{o/w}$ est quasi-identique. De plus, leurs solubilités avec le méthanol et l'eau sont pratiquement semblables comme le montre la comparaison des diagrammes ternaires heptane/méthanol/eau et limonène/méthanol/eau ainsi que le tableau comparatif des propriétés physico-chimiques des différents solvants de l'étude.

L'heptane et le limonène présentent cependant quelques dissemblances, principalement dues à la différence de densité entre les deux solvants. En effet, lors de la réalisation des systèmes heptane ou limonène/méthanol/eau en proportion 10/9/1 (v/v), la phase organique heptane se présente comme étant la phase supérieure tandis que la phase limonène la phase inférieure. Lors de leur utilisation en CPC, le mode d'utilisation de ces systèmes solvant est donc différent (ascendant ou descendant). Une faible différence de densité entre la phase limonène et la phase méthanol/eau est également constatée sur le système solvant limonène/méthanol/eau 10/9/1 (v/v) alors que la différence de densité entre les phases supérieure et inférieure est beaucoup plus importante sur le système heptane/méthanol/eau utilisé dans les mêmes proportions. Ce phénomène a des conséquences notables sur la tenue de phase stationnaire en système hydrodynamique mais aussi sur la pression en système hydrostatique.

Sur système hydrodynamique, l'utilisation du système solvant limonène/méthanol/eau 10/9/1 (v/v) s'avère compliqué. En effet, il n'y a quasi pas de rétention de phase stationnaire (inférieure à 10 % à 1200 rpm et 0,5 mL/min). Pour avoir un taux de phase stationnaire raisonnable de 50 % on estime qu'à 1200 rpm, il faudrait travailler à 0,1 mL/min soit sur une durée de 11h pour 1 volume colonne. Ceci s'avère non raisonnable, non économique et non écologique tant la durée d'une opération deviendrait importante. La seule solution est ici d'ajouter de l'heptane au limonène pour améliorer la rétention de phase mais ceci présente une perte de l'intérêt écologique car il y a ajout d'un solvant pétrolier.

Les essais en système hydrostatique montrent qu'il est tout à fait possible de retenir la phase stationnaire du système solvant limonène/méthanol/eau 10/9/1 (v/v). En effet, à 2500 rpm et 2 mL/min, le taux de phase stationnaire est supérieur à 50 %. La séparation du méthylparaben et du diéthylphthalate à différents débits est donc réalisable. La faible différence de densité entre les phases supérieure et inférieure rencontrées dans le système limonène/méthanol/eau 10/9/1 (v/v) est ici un grand avantage car elle ne crée que très peu de pression contrairement au système heptane/méthanol/eau 10/9/1 (v/v). Le système limonène/méthanol/eau permet donc de travailler à forte vitesse de rotation sans risquer d'endommager les joints tournants des appareils de CPC.

En se penchant sur l'affinité de trois solutés tests (diéthylphthalate, benzène et toluène) sur les phases supérieures et inférieures des systèmes heptane et/ou limonène/méthanol/eau en proportions 10/9/1 (v/v), on constate seulement une légère modification des coefficients de partage des composés. Ainsi, plus la proportion de limonène augmente au sein du système solvant, plus le K_d est important. Les trois solutés tests ont donc une affinité un peu plus importante pour le limonène, probablement due aux interactions π - π entre le limonène et les solutés.

Au vu des faibles différences constatées entre le limonène et l'heptane en termes de coefficient de partage des solutés et de polarité, le limonène semble être un bon compromis à l'heptane. Du fait de la faible différence de densité observée entre les deux phases du système solvant limonène/méthanol/eau en proportions 10/9/1 (v/v), ce dernier ne peut cependant être utilisé qu'en CPC hydrostatique. Cette faible différence de densité s'avère être un avantage puisque le système ne crée que très peu de pression au sein de la colonne. Sa faible toxicité et son origine bio-sourcée font donc du limonène une alternative intéressante à l'heptane, solvant pétrolier.

3.2. Système solvant Arizona vert

Dans le paragraphe précédent, à travers l'étude d'un système solvant ternaire, nous avons pu constater qu'il était possible de remplacer l'heptane, un solvant d'origine pétrolière et relativement toxique par un solvant équivalent et d'origine bio-sourcée : le limonène.

Au cours du chapitre 3, nous avons pu mettre en place une méthodologie de changement d'échelle à l'aide de la séparation de trois solutés tests et d'un système solvant Arizona composé d'heptane, d'acétate d'éthyle, de méthanol et d'eau. Sachant que l'heptane est remplaçable par du limonène, nous avons cherché à savoir s'il était également possible de remplacer le méthanol, lui aussi d'origine non renouvelable et dangereux pour la santé, par de l'éthanol, agrosolvant non toxique. Le système solvant Arizona deviendrait ainsi le système solvant Arizona vert, composé de limonène, d'acétate d'éthyle, d'éthanol et d'eau.

3.2.1. Propriétés physico-chimiques

3.2.1.1. Présentation de l'article

Cette section est présentée sous la forme d'une publication évoquant les propriétés physico-chimiques d'un nouveau système solvant vert, composé de limonène, d'acétate d'éthyle, d'éthanol et d'eau. Cet article intitulé « Limonene in Arizona liquid systems used in countercurrent chromatography – I. Physico-chemical properties » (27) est paru en 2014 dans la revue *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Il est la première partie d'une série de deux articles traitants de la possible utilisation de ce système solvant alternatif en CPC.

L'objet de cette publication est de remplacer l'heptane par du limonène, dont l'étude précédente a montré que cet échange n'impactait peu les séparations en CPC (26), et le méthanol par de l'éthanol, beaucoup moins toxique et également issu de filières bio-sourcées. Ainsi, en gardant les mêmes proportions volumiques des solvants entre eux, le système solvant classique composé d'heptane/acétate d'éthyle/méthanol/eau est comparé au système solvant « vert » composé de limonène/acétate d'éthyle/éthanol/eau.

Dans un premier temps, les propriétés physico-chimiques de chaque solvant composant les systèmes Arizona classiques et verts seront regroupées dans un tableau afin de pouvoir les comparer entre elles. Ces propriétés physico-chimiques seront également utilisées pour la compréhension de diagrammes ternaires tracés en volume, en masse et en fraction molaire. En second lieu, les systèmes solvants

Arizona classique et vert seront confrontés à travers le tracé de diagrammes quaternaires. Les compositions et la différence de densité entre les phases supérieure et inférieure du système solvant Arizona vert seront ensuite analysées afin d'établir les différences avec le système classique en terme de répartition des solvants au sein des phases et de préparer une future séparation par CPC. La question de la différence de polarité entre les systèmes solvant sera également abordée.

Limonene in Arizona liquid systems used in countercurrent chromatography. I Physicochemical properties

Karine Faure · Elodie Bouju · Pauline Suchet ·
Alain Berthod

Received: 7 March 2014 / Revised: 24 June 2014 / Accepted: 26 June 2014 / Published online: 1 August 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Limonene is a biorenewable cycloterpene solvent derived from orange peel waste. Its potential as a “green” solvent to replace heptane was recently evaluated. Countercurrent chromatography (CCC) is a preparative separation technique using biphasic liquid systems. One liquid phase is the mobile phase; the other liquid phase is the stationary phase held in place by centrifugal fields. A particular range of special proportions of the heptane/ethyl acetate/methanol/water system is called the Arizona (AZ) liquid system when the heptane/ethyl acetate ratio is exactly the same as the methanol/water ratio. A continuous polarity decrease is obtained between the most polar **A** composition (ethyl acetate/water or 0/1/0/1 v/v) and the least polar **Z** composition (heptane/methanol or 1/0/1/0 v/v), replacing heptane by limonene and methanol by ethanol produce biphasic liquid systems much more environmentally friendly than the original AZ compositions. The chemical compositions of the two liquid phases of 12 AZ limonene/ethyl acetate/ethanol/water proportions were fully determined by Karl-Fisher titration of water and by gas chromatography for the organic solvents. The results were compared with the compositions of the corresponding AZ mixtures containing heptane and methanol. Significant differences in ethyl acetate and ethanol distribution between phases of the two systems with identical volume proportions were established. The ratio of the upper phase over the lower phase volumes and the phase density difference are important in CCC, there are also significant differences between the classic and “green” AZ systems that are discussed.

Keywords Limonene · Ethanol · Arizona biphasic liquid systems · Countercurrent chromatography · Phase composition · Phase polarity

Introduction

The environmental impact of a chemical purification can be minimized by acting on (1) the process itself and (2) the nature of the solvents used [1]. Countercurrent chromatography (CCC) is a purification process working with two liquid phases. One phase of a biphasic liquid system is selected to be the stationary phase held in place by centrifugal fields. The other liquid phase is the mobile phase, so that CCC is related to liquid–liquid extraction like liquid chromatography (LC) is related to solid phase extraction. CCC can be considered as a multi-stage liquid–liquid extraction process. The different stages are continuously traveled corresponding to the theoretical plates of the single CCC instrument that can be called a “column” by analogy with LC [2, 3]. CCC was demonstrated to be able to purify chemicals using much less solvent volume than classic preparative LC with silica-based stationary phases [4]. The CCC parameters to improve solvent-saving and productivity were investigated [5]. It is demonstrated here that CCC has great potential in the present “green” approach trend to seek for environmentally friendly purification processes [4–7]. It is excellent to use less solvent, but an interesting field to investigate is to use renewable solvents with much less impact on the environment.

Limonene is a renewable apolar solvent, a cyclic monoterpene of molecular formula $C_{10}H_{16}$ extracted as the D-isomer, from orange peel oil. We recently showed that limonene was able to replace the petroleum-based heptane solvent in selected CCC applications with the

K. Faure · E. Bouju · P. Suchet · A. Berthod (✉)
Institut des Sciences Analytiques, Université de Lyon, CNRS, 5 rue
de la Doua, 69100 Villeurbanne, France
e-mail: berthod@univ-lyon1.fr

limonene/methanol/water biphasic liquid system [8]. Ethanol is a renewable polar solvent less toxic than methanol. The Arizona scale is a range of compositions of the heptane/ethyl acetate/methanol/water system with the requirement that the heptane/ethyl acetate ratio must be exactly the same as the methanol/water ratio [9]. The scale ranges from the **A** - most polar ethyl acetate/water biphasic system or 0/1/0/1 v/v composition to the **Z** - least polar heptane/methanol biphasic system or 1/0/1/0 v/v composition. The 23 initially defined compositions (letters E, I, and O excluded) are listed in Table 1. The AZ system was named after the postal code of the Arizona US state [10]. We showed that substituting heptane for hexane or other alkanes produced little changes in phase compositions [11]. The AZ solvent system is UV transparent, has a large polarity window, and produces predictable volumes of upper and lower phases with fast equilibration of the solvents. All these advantages make it one of the biphasic liquid systems most often used in CCC separations of natural products present in traditional Chinese

herbal medicines [12]. In this work, the greener Arizona system made with limonene, ethyl acetate, ethanol, and water is studied.

In a classic CCC run, there is no equal volume use of the two liquid phases: most often a much larger volume of mobile phase is needed compared with the volume of stationary phase. Then, preparing the AZ composition by mixing the solvent proportions listed in Table 1 may not produce the desired volume of mobile phase, or a large volume of useless stationary phase will be left over. Recycling is always possible, but the logical way is to know the exact chemical composition of the desired liquid phase and to prepare it accordingly. The phase composition of AZ systems made with different alkanes was determined [11]. A similar work was done in this paper with the green AZ system limonene/ethyl acetate/ethanol/water. Experiments with test solutes were also done to estimate the polarity range of the “green” AZ system as presented in the second part of this work [13].

Table 1 The 23 Arizona compositions as defined by Margraff [9]

Letter	v/v/v/v				Initial %v/v		Classic	Green
	Heptane or limonene	Ethyl acetate	Methanol or ethanol	Water	Oil or alcohol	Ethyl acetate or water	Up/low phase ratio hept/MeOH	Up/low phase ratio limon/EtOH
A	0	1	0	1	0.0	50.0	0.88	0.92
B	1	19	1	19	2.5	47.5	0.92	0.95
C	1	9	1	9	5.0	45.0	0.965	0.99
D	1	6	1	6	7.1	42.9	0.96	1.00
F	1	5	1	5	8.3	41.7	0.95	1.00
G	1	4	1	4	10.0	40.0	0.95	1.03
H	1	3	1	3	12.5	37.5	0.945	1.08
J	2	5	2	5	14.3	35.7	0.91	1.09
K	1	2	1	2	16.7	33.3	0.88	1.07
L	2	3	2	3	20.0	30.0	0.84	1.02
M	5	6	5	6	22.7	27.3	0.80	1.00
N	1	1	1	1	25.0	25.0	0.70	0.98
P	6	5	6	5	27.3	22.7	0.69	0.87
Q	3	2	3	2	30.0	20.0	0.68	0.82
R	2	1	2	1	33.3	16.7	0.68	0.73
S	5	2	5	2	35.7	14.3	0.70	0.67
T	3	1	3	1	37.5	12.5	0.735	0.65
U	4	1	4	1	40.0	10.0	0.76	0.61
V	5	1	5	1	41.7	8.3	0.78	0.57
W	6	1	6	1	42.9	7.1	0.775	1.7 ^a
X	9	1	9	1	45.0	5.0	0.77	2.2 ^a
Y	19	1	19	1	47.5	2.5	0.71	One phase
Z	1	0	1	0	50.0	0.0	0.45	One phase

The upper organic over lower aqueous phase volume ratios are given for the freshly prepared heptane or limonene containing liquid systems

^aPhase inversion: For systems W and X, the lower phase is the organic limonene-rich reduced-volume phase

Table 2 Physicochemical properties of the “green” and classic Arizona solvents

Solvent	m.w. g mol ⁻¹	d g cm ⁻³	η cP	b.p. °C	n refractive index	ϵ	γ mN m ⁻¹	water solubility % w/w	UV cut off nm	log P _{o/w}
Heptane	100	0.683	0.41	98.4	1.388	1.92	20.8	0.0003	200	4.50
Limonene	136	0.841	0.93	178	1.472	2.37	28.5	0.08	250	4.58
Ethyl acetate	88	0.901	0.45	77.1	1.372	6.0	23.9	8.7	256	0.78
Methanol	32	0.791	0.55	64.5	1.328	32.7	22.6	∞	205	-0.74
Ethanol	46	0.790	1.20	78.4	1.361	24.3	22.4	∞	210	-0.31
Water	18	0.998	1.00	100	1.333	80.1	72.8	∞	190	-1.48

Molecular weight, density, viscosity, boiling point, refractive index, dielectric constant, surface tension, solubility of solvent in water, UV cut-off, and log of octanol/water partition coefficient at 20 °C from references 14 and 15

Experimental

Reagents and solutions

All reagents were of analytical grade and used without further purification. Distilled deionized water was produced by Elga

Purelab Classic (Elga Labwater, Antony, France) with a resistivity of 18 M Ω cm or more. Limonene was obtained from Fluka Analytical, a division of Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau Chesnes, France. It is a >93 % pure *d*-limonene or (R)-(+)-limonene, CAS 94266-47-4, with the *l*-limonene enantiomer and trace amounts of other terpene hydrocarbons such as

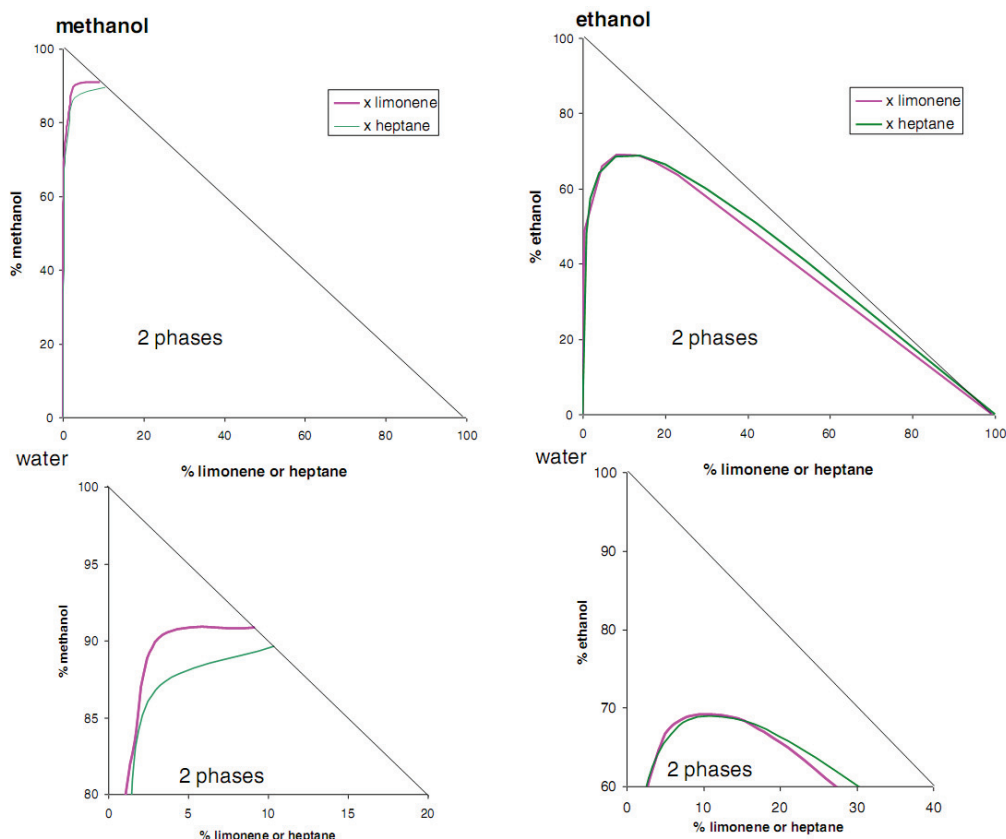


Fig. 1 Ternary phase diagram of the hydrocarbon/alcohol/water systems in molar fraction at room temperature. Left: limonene or heptane/methanol/water diagrams. Right: limonene or heptane/ethanol/water diagrams.

The lower diagrams are enlargements of the alcohol apex. Data for the methanol diagrams were taken in [7]. Data for the heptane/ethanol/water diagram were taken in [16]

myrcene, alpha-pinene and linalool as by-products also present in orange peel oil, the source of limonene. Ethanol and ethyl acetate were all obtained from Sigma-Aldrich and used as received.

Phase composition determination

The mixture of the four solvents making a given Arizona proportion was equilibrated in a 25 mL vial for 2 h at room temperature ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) before analyzing the phase composition. The relative volume of the phases was directly measured by pouring the vial content in a 25 mL graduated cylinder and waiting for phase separation. The phase density was determined by weighting 10 mL of each phase in a calibrated vial. The water content of both the upper organic and the lower aqueous phase was determined using a Karl Fisher titrator Metrohm model 652 (Herisau, Switzerland). A known volume of upper phase was directly introduced into the coulometric cell. The lower aqueous phases of compositions C to P contained large amounts of water. They were diluted in nine volumes of anhydrous ethanol before coulometric water

titration. The relative average accuracy on water content measurement by Karl Fisher titration is estimated to be $\pm 2\%$.

Ethyl acetate, ethanol, and limonene were determined by gas chromatography using a Perkin Elmer Autosystem (Waltham, MA, USA) gas chromatograph with a 30 m macrobore column Supelco Equity 5, 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness of polydimethylsiloxane with 5 % phenyl, and a flame ionization detector. The helium carrier gas pressure was set at 80 kPa with a 1/50 split injection ratio. The oven temperature was set at $80\text{ }^{\circ}\text{C}$. The working temperature program was $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 3 min followed by a $20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ramp to reach $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 4 min and hold at $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 2 min before returning to $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for the next run. Four known solutions of ethyl acetate, ethanol, and limonene were prepared in methylene chloride to calibrate the FID detector response. The regression coefficients of the linear calibration curves were equal or higher than 0.999. The relative average accuracy on organic compound content was estimated to be $\pm 2\%$.

Pooling the Karl Fisher (water % v/v) and gas chromatography (ethyl acetate, ethanol, and limonene % v/v) results gave a total proportion between 96 and 103 % v/v. The four percentages were arithmetically adjusted so that their sum was exactly 100 % without uncertainty indication.

Results and discussion

Solvent physicochemical properties

Table 2 lists the physicochemical properties of the different solvents used in the Arizona biphasic liquid systems [14, 15]. We assume that the low amount of non-*d*-limonene impurities in our limonene solvent will not affect the results significantly. The table shows significant polarity differences through the octanol/water partition coefficient listed as a polarity indicator. The high $\log P_{\text{o/w}}$ of the two hydrocarbons with both having a similar $\log P_{\text{o/w}}$ around 4.5 ($P_{\text{o/w}}$ around 30,000) is linked to their very low polarity. The two short-chain alcohols have low $\log P_{\text{o/w}}$ values of -0.74 and -0.31 , respectively, corresponding to $P_{\text{o/w}}$ of 0.2 and 0.5. They are both similarly polar solvents. Ethyl acetate is the moderately polar solvent that will distribute between the organic and aqueous phases ($P_{\text{o/w}} = 6$). Indeed, solvent polarity and water solubility are related: the low polarity of the hydrocarbons is associated with very low water solubility when short-chain alcohols are fully miscible with water. However, limonene, with 800 ppm or mg/L soluble in water at $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, is significantly more soluble than heptane (3 ppm, Table 2).

Temary phase diagrams

We want first to point out that the diagrams are obtained at room temperature, $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, when temperature variations

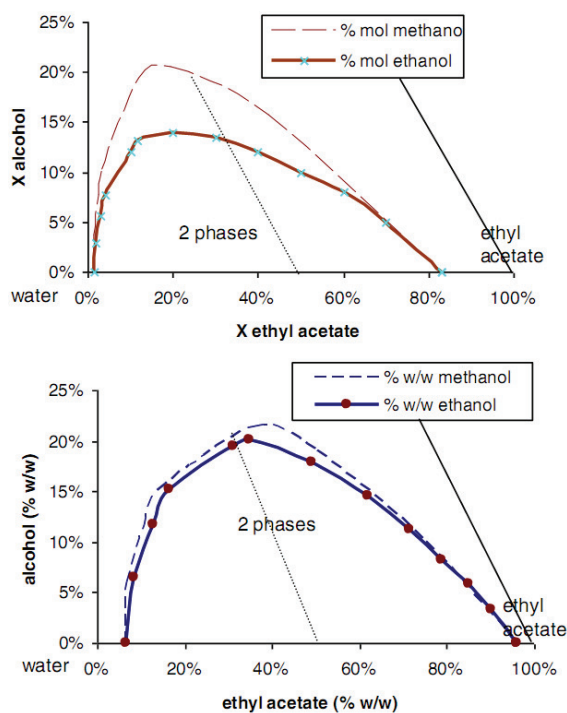


Fig. 2 Binodal curves of the ethyl acetate/alcohol/water systems in molar fraction (top) and mass fraction (bottom) at room temperature. Full lines: ethanol; dashed lines: methanol. The diagrams are enlargements of the lower biphasic parts of the full diagrams. Dotted lines: alcohol dilution of the 50-50 water-ethyl acetate mixtures, see text. Data for the methanol diagrams were taken in [14]. Data for the ethyl acetate/ethanol/water diagram were taken in [17]

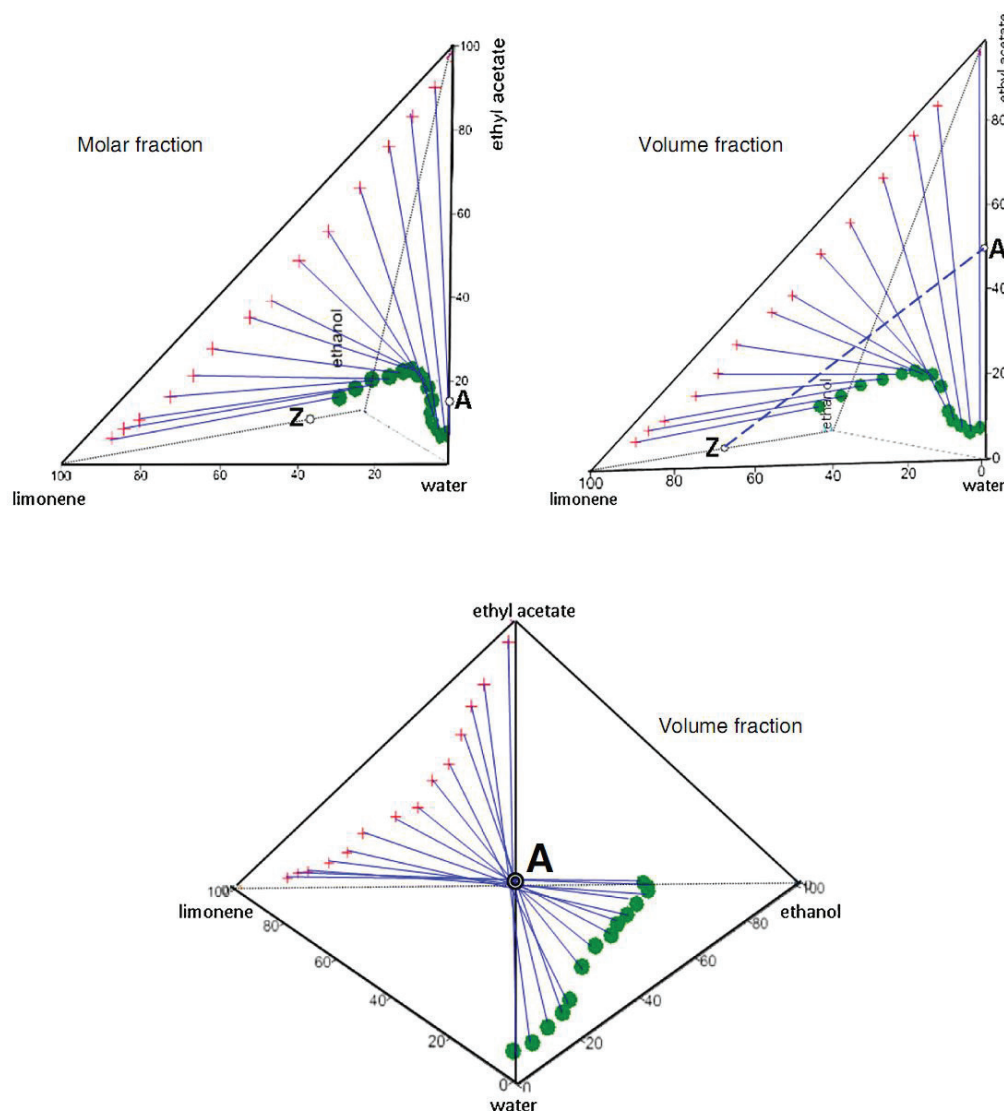


Fig. 3 Three-dimensional representation in cartesian coordinates of the limonene/ethyl acetate/ethanol/water system in molar fraction (top left) and volume fraction (top right and bottom). Data in Table 3. Crosses:

upper phase; circles: lower phase. The bottom view shows that the tie lines cross the A-Z line in the volume representation only; the A composition is on top exactly covering the Z composition

may slightly modify phase diagrams. These diagrams are aimed to CCC practitioners and, as a rule of thumb, we recommend working with liquid compositions far enough from a demixion line to avoid any problem attributable to temperature changes inside the CCC column.

In our recent work [8], the limonene/methanol/water phase diagram was found to be very similar to the heptane/methanol/water one. Figure 1 shows these two diagrams superimposed and represented in the molar fraction scale. The limonene/ethanol/water ternary phase diagram was experimentally determined titrating selected

limonene/ethanol mixtures. It is shown in Fig. 1, also in the molar fraction scale, with the heptane/ethanol/water diagram taken from the literature [16]. The similarity between the two heptane/ethanol/water and limonene/ethanol/water confirm previous observations suggesting that limonene has solvating properties similar to heptane [8].

Figure 2 shows the ethyl acetate/alcohol/water ternary phase diagrams in both mole fraction and weight percentage [17]. A significant difference between the molar methanol and ethanol phase diagrams is observed when the two weight phase diagrams are very close. The volume phase diagrams

Table 3 Composition of the limonene/ethyl acetate/ethanol/water upper and lower phases of selected proportions of the Table 1 Arizona range in volume percentages at room temperature

Code	Upper phase % v/v					Lower phase % v/v				
	Limonene		Ethyl acetate	Water	Density g/cm ³	Limonene	Ethyl acetate	Ethanol	Water	Density g/cm ³
A	0.00	96.50	0.00	3.50	0.902	0.00	7.17	0.00	92.83	0.992
C	10.39	83.21	3.28	3.05	0.881	0.01	5.82	6.14	88.58	0.980
F	18.10	73.00	6.00	2.90	0.883	0.02	7.00	11.00	82.00	0.975
H	34.00	51.25	12.00	2.75	0.872	0.04	8.40	18.80	72.70	0.964
K	40.00	42.90	14.40	2.70	0.863	0.12	10.80	22.70	66.40	0.954
L	42.50	40.00	15.00	2.50	0.859	0.16	16.00	22.00	62.00	0.942
M	45.00	38.05	14.60	2.35	0.855	0.38	18.75	26.53	54.34	0.930
N	50.25	34.63	13.22	1.90	0.851	0.70	18.00	33.00	48.30	0.919
P	61.00	26.50	11.00	1.56	0.842	1.45	19.40	35.00	44.00	0.902
Q	66.55	22.05	10.05	1.35	0.840	3.00	18.50	40.00	38.00	0.895
R	73.05	17.20	9.00	0.75	0.840	4.40	20.30	46.20	29.10	0.880
T	80.70	10.00	8.50	0.55	0.834	8.70	15.00	54.30	22.00	0.867
U	84.00	7.45	8.33	0.50	0.828	12.70	12.00	59.00	16.30	0.847
V	87.00	5.50	8.00	0.45	0.825	15.00	9.00	62.00	14.00	0.828
W ^a	87.70	4.50	7.50	0.30	0.845	17.00	7.40	63.60	12.00	0.834
Z	Single clear phase					Single clear phase				

Karl Fisher titrations for water determination, accuracy 2 %; gas chromatography for solvent quantitation, accuracy 4 %. The results were adjusted so that the sum of the four percentages is exactly 100 %

^aPhase inversion for composition **W**: the aqueous phase is the lighter phase, the limonene phase is slightly denser forming milky emulsion taking hours to separate

of the two systems are also very close (not shown). For example, a 50/50 % v/v mixture of equal volumes of water and ethyl acetate forms a biphasic system. Expressed in mass fraction, this system composition is ethyl acetate/water 47/53 % w/w. But expressed in mole fraction, the system composition is 15/85 mole%. These differences are due to the water and ethyl acetate density differing by 10 % when the molecular weight of water is five times lower than that of ethyl acetate (Table 2). It is necessary to add to the biphasic 50/50 ethyl acetate/water system about 20 % methanol in mole fraction to get a clear single phase solution when only 13 % ethanol will give the same result (dotted line, Fig. 2 top). Expressed in volumes (masses), 24 % v/v (21 % w/w) methanol and 23 % v/v (20 % w/w) ethanol additions would make a clear solution (dotted line, Fig. 2, bottom). Ethanol has solvating ability toward water-immiscible compounds significantly higher than methanol when expressed in mole fraction.

Quaternary phase diagram

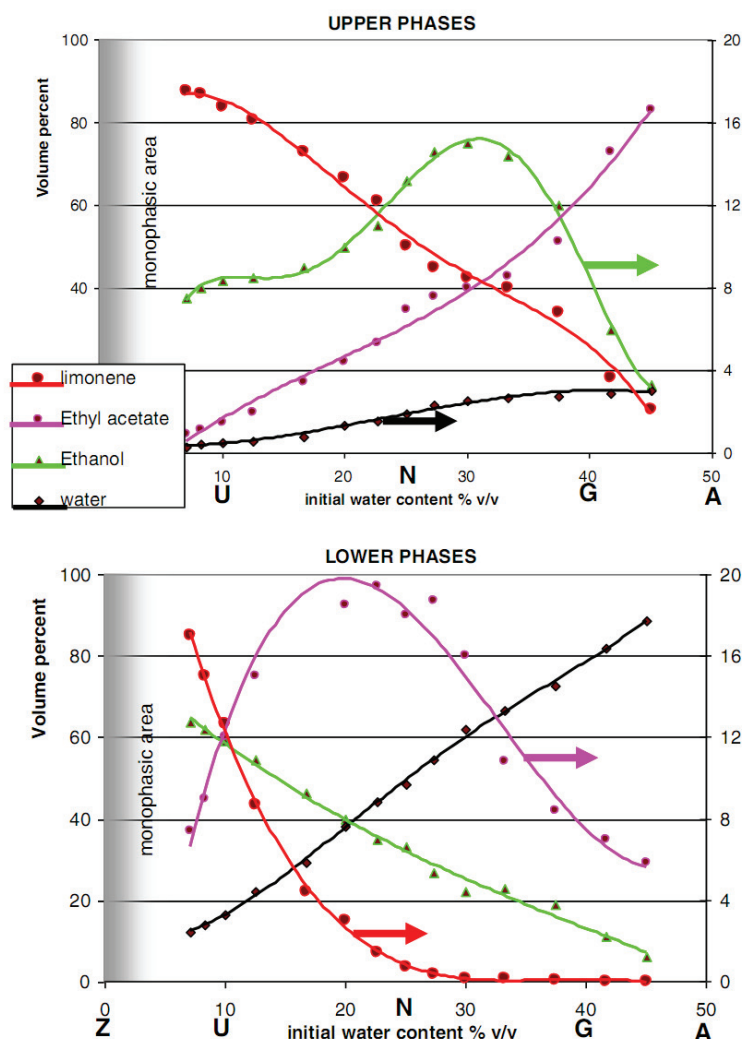
Four solvents are involved in the studied Arizona systems. Working in relative proportions, the relationship:

$$\text{limonene \%} + \text{ethanol \%} + \text{ethyl acetate \%} + \text{water \%} = 100 \% \quad (1)$$

reduces the variable to three making possible to represent the quaternary phase diagram in three dimensions. The percentage units can be expressed in either volume, mass, or molar fraction percentages. The exact diagram representation would be a symmetrical tetrahedron made with four equilateral triangles and whose four apexes represent the four pure solvents. This symmetrical tetrahedron and its four equilateral triangles have twelve 60° angles that modern graphics software can handle. Cartesian coordinates with three X, Y, Z axes at right angles are much easier to manipulate with common spreadsheets. Figure 3 shows the Cartesian representation of the Table 3 results in molar fraction (top left) and volume percentages (top right and bottom). For each studied Arizona proportion, a tie-line joins the upper phase and lower phase corresponding compositions. If the two representations show similarities, the molar tie lines do not cross on the AZ lines as they do in the volume percentage representation (Fig. 3, bottom). This is due to the phase compositions being selected in volumes by definition of the Arizona scale (Table 1). For example, the molar values corresponding to Point **A** and Point **Z** are not located exactly in the middle of the ethyl acetate/water molar axis (**A**) and limonene/ethanol molar axis (**Z**) as they, respectively, are with the volume axes (Fig. 3).

Figure 4 shows the Table 3 values plotted versus the amount of water initially introduced in the quaternary mixture. The upper organic phase compositions show a regular change

Fig. 4 Upper and lower phase volume compositions (% v/v) of the limonene/ethyl acetate/ethanol/water quaternary liquid system. Top diagram: upper phase compositions; ethanol and water: right scale. Bottom diagram: lower phase composition in volume %; limonene and ethyl acetate: right scale. Room temperature

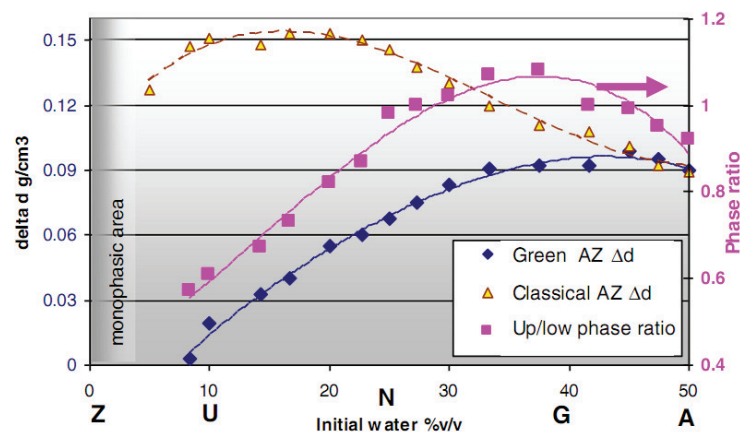


in limonene (decreasing), ethyl acetate (increasing), and even water (slightly increasing) contents as the selected Arizona proportion is made with more water (i.e., going from the **Z** toward the **A** composition). The middle Arizona upper phase compositions contain up to 15 % v/v ethanol around proportions **K**, **L**, and **M**. Ethyl acetate shows a concentration maximum in the middle lower phases, but this maximum is shifted toward higher letters (proportions **N**, **P**, **Q**, and **R**) or less polar Arizona compositions. A regular variation of the water (increasing) and ethanol (decreasing) concentrations is observed as the Arizona composition contains more water (Fig. 4, bottom). For compositions made with less than 25 % v/v water or letters higher than **N**, a significant amount of limonene is located in the lower aqueous phase. The “aqueous” phase of proportion **W** contains 17 % v/v of limonene and only 12 % v/v of water (Table 3). Expressed in molar

fractions, these values become only 5.4 % limonene for 34.3 % water.

Figure 5 shows the development of both the upper phase volume over lower phase volume ratio and the phase density difference. The phase density difference is around 0.1 g/cm³ for the polar compositions (letters **A** to **K**). Next, as less water is present in the **AZ** compositions, the density difference decreases because the lower phase enriches in ethanol, the less dense solvent almost cancels for composition **W**. The phase volume ratio follows a similar trend (Fig. 5): the polar **AZ** compositions from **A** to **N** separate in very similar volumes of both phases (phase ratio between 0.9 and 1.1). For less polar compositions, more limonene goes into the lower aqueous phase (Fig. 4 and Table 3) whose relative volume increases. The **U** composition (4/1/4/1) gives one-third of upper phase for two-third of lower phase.

Fig. 5 Upper phase over lower phase volume ratio (squares and right axis) and density difference (lozenges and left axis) of the AZ compositions of the limonene/ethyl acetate/ethanol/water “green” liquid system. The dotted line with open triangles shows the density difference between the two liquid phases of the classical heptane/ethyl acetate/methanol/water system, data from [11]



“Green” vs. classic Arizona solvent scales

The major difference between the “green” limonene/ethanol/ethyl acetate/water and the heptane/methanol/ethyl acetate water systems is the full miscibility of limonene and ethanol when heptane and methanol form a biphasic liquid system at room temperature (composition **Z**) [11]. Proportions **Y** and **Z** (Table 1) form a clear solution with limonene and ethanol (single phase). Proportions **W** and **X** form milky biphasic systems that take several tenths of minutes to settle into two cloudy phases. These systems will not be useful in CCC, the two phases having too close densities and too long settling times.

The second major difference between the “green” and classical Arizona systems is the polarity difference between ethanol and methanol. The complete water solubility and respective $\log P_{o/w}$: -0.31 and -0.74 values of the short chain alcohols seem to describe two polar solvents. However, this apparent small polarity difference has significant consequences. Ethanol distributes itself between the organic and aqueous phases of the limonene AZ system much better than methanol does in the heptane AZ system. The **N** composition is a good example of this partitioning difference. The middle **N** composition contains the same volume of all four solvents (1/1/1/1). Table 3 shows that 98.6 % of the initially poured limonene volume goes in the upper organic phase when 96.4 % of water goes in the lower phase. Ethyl acetate partitions go for 65.7 % in the upper **N** limonene phase and 34.3 % in the lower **N** aqueous phase. Ethanol also partitions going for 28.6 % in the upper **N** phase and 71.4 % in the lower **N** aqueous phase. Taking the data in [12] for the classic heptane/ethyl acetate/methanol/water homothetic 1/1/1/1 **N** system, it is observed that 99.8 % of heptane, 65.3 % of ethyl acetate, and only 6.1 % of initially mixed methanol go into the upper **N** heptane phase; 98.8 % of water, 34.7 % of ethyl acetate, and 93.9 % of methanol go into the lower **N** aqueous phase. The presence of significant amounts of ethanol into the organic

upper phases of the “green” limonene-based AZ system will raise their polarity and induce CCC separation differences when comparing with the same AZ compositions made with the classical solvents.

A serious consequence of these composition differences between the “green” limonene-based AZ system and the classic one are seen on density differences between phases. The dotted line with open triangles in Fig. 5 shows the density difference between classic AZ phases. This density difference is always greater than 0.09 g/cm³ passing 0.15 g/cm³ for **P** to **U** compositions. The lower heptane AZ value of 0.09 g/cm³ is actually the maximum density difference obtained with the “green” limonene AZ system and this maximum 0.09 g/cm³ density difference is obtained for polar compositions **A** to **H** only (Table 3 and Fig. 5, lozenges). The density difference between liquid phases is a very important parameter in CCC separation: it is linked to the liquid stationary phase retention ratio, S_R , in hydrodynamic CCC equipment and to the driving pressure needed to circulate the mobile phase in hydrostatic CCC equipment as will be studied in the associated article [13].

Conclusion

The knowledge of the exact chemical composition of the two liquid phases in equilibrium used in CCC is important allowing for significant solvent saving operating CCC columns. Replacing heptane with limonene and methanol with ethanol give the much more environmentally friendly limonene/ethyl acetate/ethanol/water biphasic system that has significantly different phase composition compared with the same proportions of the heptane/ethyl acetate/methanol/water classical system. The upper organic limonene-rich phases of the “green” system contain two to six times more ethanol (% v/v) than the corresponding compositions of the

upper phases of the classic heptane-rich system. This is compensated by less limonene in the upper phases and more in the lower phases. These changes in composition associated with the higher density of limonene compared with that of heptane are responsible for a very low density difference between the two liquid phases of the limonene-based AZ system. This low density difference has significant consequences in the use of such AZ system in CCC operation. Also, the composition differences will be responsible for change in solute partitioning between phases.

Acknowledgments K.F. and A.B. thank the French Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS ISA UMR5280) for continuous support. E.B. and P.S. thank Roussellet Centrifugation (Annonay, France) for, a 3-year CIFRE PhD grant and a 1-year industrial grant respectively.

References

- Curzons AD, Constable DJC, Mortimer DN, Cunningham VL (2001) *Green Chem* 3:15–26
- Conway WD (1990) *Countercurrent Chromatography, Apparatus, Theory, and Applications*. VCH Publishers, Weinheim
- Berthod A (2002) *Countercurrent chromatography, the support-free liquid stationary phase (comprehensive analytical chemistry)*, vol 38. Elsevier, Amsterdam
- DeAmicis C, Edwards NA, Giles MB, Harris GH, Hewitson P, Janaway L, Ignatova S (2011) *J Chromatogr A* 1218:6122–6127
- Faure K, Mekaoui N, Berthod A (2014) In: Inamuddin D, Mohammad A (eds) *Green Chromatographic Techniques*, Vol XII, Chap 1, Springer, Dordrecht, pp 1–19
- Zhang M, Ignatova S, Hu P, Liang Q, Wang Y, Luo G, Sutherland IA (2011) *J Chromatogr A* 1218:6031–6037
- Berthod A (2009) In: Grushka E, Grinberg N (eds) *Advances in Chromatography*, vol. 47, CRC Press, Boca Raton, pp 323–352
- Faure K, Bouju E, Suchet P, Berthod A (2013) *Anal Chem* 85:4644–4650
- Margraff R (1994) In: Foucault A (ed) *Centrifugal Partition Chromatography, Chromatographic Science Series*, Vol. 68, Marcel Dekker, New York, pp 331–350
- Renault JH, Nuzillard JM, Intes O, Maciuk A (2002) *Countercurrent Chromatography, the Support-Free Liquid Stationary Phase*. In: Berthod A (ed) *Comprehensive Analytical Chemistry*, vol 38. Elsevier, Amsterdam, pp 49–83
- Berthod A, Hassoun M, Ruiz-Angel MJ (2005) *Anal Bioanal Chem* 383:327–340
- Sutherland IA, Fisher D (2009) *J Chromatogr A* 1216:740–753
- Faure K, Bouju E, Doby J, Berthod A (2014) submitted article.
- Kerton FM, Marriott R (2013) *Alternative Solvents for Green Chemistry*, 2nd ed., Chap 6, Royal Soc Chem, London, pp 149–174
- Lide DR (2009) *Handbook of Chemistry and Physics*, 89th edn. CRC Press, Boca Raton
- Letcher TM, Wootton S, Shuttleworth B, Heyward C (1986) *J Chem Thermodyn* 18:1037–1042
- Lee LS, Chen WC, Huang JF (1996) *J Chem Eng Jpn* 29:427–438

3.2.1.2. Conclusion

Le premier article de cette série traite donc de l'analyse des propriétés physico-chimiques des solvants composant le système Arizona dit classique (heptane/acétate d'éthyle/méthanol/eau) et le système solvant Arizona vert (limonène/acétate d'éthyle/éthanol/eau). Comme constaté dans la publication reproduite dans le paragraphe 3.1, les polarités du limonène et de l'heptane apparaissent très similaires. Il en est de même avec les polarités du méthanol et de l'éthanol qui se révèlent également proches. L'observation de la solubilité des différents solvants avec l'eau montre que les alcools sont tous deux intégralement solubles dans l'eau. Au contraire, une légère différence de solubilité avec l'eau est constatée pour les deux hydrocarbures : tandis que l'heptane est soluble à 3 mg/L dans l'eau, le limonène est soluble à 800 mg/L dans l'eau.

La représentation des diagrammes ternaires hydrocarbures/alcools/eau à l'échelle de la fraction molaire confirme ici encore que l'heptane et le limonène sont bien deux solvants similaires comme cela avait été montré lors de la présentation de la publication « Use of Limonene in Countercurrent Chromatography: A Green Alkane Substitute » (26). En observant le diagramme ternaire acétate d'éthyle/alcools/eau, on peut voir qu'il faut moins d'éthanol pour solubiliser le système acétate d'éthyle/eau que de méthanol.

En se penchant sur les différentes proportions du système solvant Arizona vert, plusieurs points ont pu être mis en avant. Tout d'abord, les systèmes solvants Arizona vert les plus apolaires (Y et Z) ne comportent qu'une seule phase, ceci étant dû à la solubilité du limonène avec l'éthanol, non retrouvée entre l'heptane et le méthanol dans le système Arizona classique. En remontant la gamme des solvants verts légèrement plus polaires (W et X), les systèmes deviennent bien biphasiques, mais ces derniers restent très longs à décanter, ce qui peut vraisemblablement empêcher leur utilisation en CPC.

L'observation de la distribution des solvants au sein des systèmes biphasiques montre que malgré la faible différence de polarité entre les deux alcools, l'éthanol se distribue de manière beaucoup plus importante dans la phase organique que le méthanol. Le système solvants Arizona vert en devient alors plus polaire, modifiant le partage des solutés au sein des phases par rapport à un Arizona classique.

Un comparatif des différences de densité entre les phases supérieures et inférieures des deux types de systèmes solvants est réalisé dans cette étude. Il montre que la différence de densité est beaucoup plus faible sur le système Arizona vert par rapport au système Arizona classique. Cette faible différence de densité comporte un risque sur la tenue de phase stationnaire sur des appareils hydrodynamiques qui supportent mal les systèmes biphasiques dont les différences de densité sont faibles (26).

Les propriétés physico-chimiques du système solvant Arizona vert ayant été étudiées et comparées au système solvant Arizona classique, des essais en conditions réelles peuvent à présent être réalisés sur des appareils hydrodynamiques et hydrostatiques. Ces expériences font l'objet du second article de la série, présenté ci-après.

3.2.2. Système solvant Arizona vert : polarité et rétention de phase stationnaire

3.2.2.1. *Présentation de l'article*

Après la présentation des propriétés physico-chimiques du système solvant Arizona vert composé de limonène, d'acétate d'éthyle, d'éthanol et d'eau, l'objet de cette section est de présenter le second volet de la série de publications traitant de l'utilisation en CPC de ce nouveau système solvant alternatif. L'article présenté ci-après, nommé « Limonene in Arizona liquid systems used in countercurrent chromatography – II. Polarity and stationary phase retention » (28) est paru en 2014 dans la revue *Analytical and Bioanalytical Chemistry*.

Dans cette deuxième publication, le système solvant Arizona vert est évalué directement sur des appareils hydrodynamiques et hydrostatiques en réalisant la séparation des trois solutés tests issus de la gamme de composés Guess utilisés lors de la mise en place de la preuve de concept de la nouvelle méthodologie changement d'échelle : le new coccine red, l'aspirine et la coumarine. Des systèmes solvant de différentes polarités sont testés sur les deux types d'appareillages afin d'étudier et de comparer l'influence de différents paramètres tels que la différence de densité sur le taux de phase stationnaire, la résolution entre les pics ou la pression. Un comparatif des coefficients de partage de l'aspirine et de la coumarine entre le système Arizona classique et le système Arizona vert est également réalisé afin d'évaluer la différence de polarité entre ces deux systèmes solvant.

Limonene in Arizona liquid systems used in countercurrent chromatography. II Polarity and stationary-phase retention

K. Faure · E. Bouju · J. Doby · A. Berthod

Received: 7 March 2014 / Revised: 24 June 2014 / Accepted: 26 June 2014 / Published online: 2 August 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract The previous article in this series described the physico-chemical properties and chemical compositions of the two phases of the limonene–ethyl acetate–ethanol–water biphasic liquid system. This system was designed to be a “green” version of the so-called Arizona (AZ) scale of heptane–ethyl acetate–methanol compositions in which the heptane–ethyl acetate volume ratio is exactly the same as the methanol–water ratio. The first major difference between the standard and “green” AZ systems is the difference in upper and lower phase densities. The higher density of limonene compared with heptane greatly reduces the density difference of the “green” system: half the compositions have a density difference lower than 0.06 g mL^{-1} , precluding their use in hydrodynamic CCC columns. The other major difference is the phase polarity. The better distribution of ethanol between the upper organic and lower aqueous phases of the “green” AZ scale renders them more polar than their counterparts in standard heptane-based compositions. The test solutes aspirin and coumarin have higher distribution constants in the “green” AZ compositions. It is revealed that a hydrostatic column is suitable for use with all “green” compositions, with very good phase retention and limited driving pressure at high flow rates. A hydrodynamic column only functioned at limited flow rates with polar compositions of sufficient phase-density difference. The CCC chromatograms obtained with different compositions and columns are shown, and their peak position and sharpness discussed.

Keywords Limonene · Ethanol · Arizona compositions · Countercurrent chromatography · Liquid systems · Polarity

K. Faure · E. Bouju · J. Doby · A. Berthod (✉)
Institut des Sciences Analytiques, Université de Lyon, CNRS, 5 rue
de la Doua, 69100 Villeurbanne, France
e-mail: berthod@univ-lyon1.fr

Introduction

Limonene is a renewable apolar solvent, a cyclic monoterpene of molecular formula $\text{C}_{10}\text{H}_{16}$ extracted, as the D isomer, from orange-peel oil. We recently revealed that limonene could replace the petroleum-based heptane solvent in selected CCC applications with the limonene–methanol–water biphasic liquid system [1]. Ethanol is also a renewable solvent, with polarity comparable to methanol but much lower toxicity. The Arizona scale of biphasic liquid systems is a range of compositions of the heptane–ethyl acetate–methanol–water system, with the requirement that the heptane–ethyl acetate ratio must be exactly the same as the methanol–water ratio [2]. The scale ranges from A, the most polar ethyl acetate–water biphasic system or 0:1:0:1 (v/v) composition, to Z, the least polar heptane–methanol biphasic system or 1:0:1:0 (v/v) composition. In the first part of this study, we revealed that substituting heptane with limonene and ethanol with methanol produced a more environmentally friendly Arizona-system scale, but with substantial differences in the chemical and physico-chemical properties of the two phases [3].

Countercurrent chromatography (CCC) is the liquid-separation technique that works with a support-free liquid stationary phase [4–6]. There are two kinds of commercially available CCC “columns”: hydrostatic machines, also called centrifugal partition chromatographs (CPC), and hydrodynamic machines. All these “columns” are actually mechanical equipment containing rotors, because centrifugal fields are used to obtain a liquid stationary phase when an immiscible liquid mobile phase is percolated through the column [2, 3]. The Arizona alkane–ethyl acetate–methanol–water systems are the biphasic liquid systems most often used in CCC separations of natural products [7, 8]. Significant differences in operating characteristics have been observed when using the two kinds of CCC column [8]. Hence, it is important to study the behavior of the “green” limonene–ethyl acetate–ethanol–water system in

CCC and compare it with the standard petroleum-based system used with the two classes of CCC column.

Experimental

Reagents and solutions

All reagents were of analytical grade and used without further purification. Distilled deionized water was produced by an Elga Purelab Classic (Elga Labwater, Antony, France) with a resistivity of 18 MΩ cm or more. Limonene was obtained from Fluka Analytical, a division of Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau Chesnes, France. Ethanol, ethyl acetate, and test solutes were all obtained from Sigma-Aldrich and used as received.

Countercurrent chromatography

The hydrodynamic CCC instruments contain spools of coiled open Teflon tubing mounted in a rotor. There are several axes: a central axis for the rotor and as many secondary axes as there are bobbins. The stationary liquid phase is maintained by a combination of rotations, creating a planetary motion combined with Archimedean forces [4–6]. The density difference between the two liquid phases results in fast mingling and decantation, enabling liquid-stationary-phase retention. There is good and uninterrupted contact between the mobile and stationary liquid phases throughout the coiled tubing length. A Spectrum CCC column containing two coils was obtained from Dynamic Extractions (Slough, Berkshire, SL1 4LP, UK). One coil was filled with distilled water, sealed and not used for experiments. The second coil, with a connected volume from injection valve to UV detector cell of 67 mL, was used in experiments. The two coils were made by winding 32.5 m of 1/8 perfluoroalkoxy polymer (Teflon PFA) tubing with a 2 mm² bore area (1.6 mm internal-tubing diameter) in five layers of 15 turns on a 60 mm bobbin. The beta ratio (β ; the coil radius over R , the distance between the rotor axis and the bobbin axis, 80 mm) was 0.93 for the external tubing layer and 0.75 for the internal one, with an average value of 0.84. The maximum rotation speed was 1800 rpm, which was able to generate a maximum centrifugal field value of 500g (Earth's gravitational field $g=9.8 \text{ m s}^{-2}$). A cooling system was used to circulate 10 °C water in the Spectrum CCC to compensate for heat generated by the rotating tubes, maintaining an internal temperature of approximately 25 °C.

The hydrostatic CCC machines, or centrifugal partition chromatographs (CPCs), contain a rotor with a single central axis that generates a constant centrifugal force. The rotor is made of stacked disks bearing engraved channels interconnected by ducts, so that there are physical chambers retaining the stationary phase. The stationary phase is tightly retained but the interconnecting ducts contain only the mobile phase, being

“dead” volumes chromatographically [4–6]. A hydrostatic apparatus FCPC-C, nicknamed R2D2 (Rousselet-Robatel Kromaton, Annonay, France), had an experimentally-measured column volume V_C of 35 mL. The R2D2 CPC has a rotor made by stacking 13 disks each containing 64 cells, making a total of 832 cells of 30 μL each. The cell volume is estimated to be 25 mL, making a “dead” volume of $35-25=10$ mL or 29 % of the CPC volume. This volume corresponds to the connecting duct volume plus the external inlet and outlet tubing [9]. The maximum rotor rotation is 3000 rpm, producing a maximum constant centrifugal field of approximately 300g [9]. The unit had an air circulation vent connected to an air–air conditioning system, blowing air at 15 °C to compensate for heat generated by the rotary seals.

Procedure

For a given experiment, a sufficient amount of the organic and aqueous phases of the selected AZ point was prepared by mixing the listed solvent volumes. The CCC column, either hydrodynamic Spectrum or hydrostatic R2D2 CPC, was first filled with the liquid phase chosen as the stationary phase. Then the rotor was started, and the other liquid phase was pumped at the desired flow rate. The other phase was pumped in the “ascending” or “tail-to-head” direction if it was the upper phase moving through the denser liquid stationary phase, whereas the denser mobile phase would be pumped in the “descending” or “head-to-tail” direction through the lighter upper stationary phase [4–6]. Part of the liquid stationary phase was displaced by the mobile phase. This stationary phase volume was collected and measured, and corresponded to the mobile-phase volume, V_m , inside the CCC column. The stationary-phase volume, V_s , is:

$$V_s = V_C - V_m \quad (1)$$

in which V_C is the column volume.

The solute retention volume, V_r , depends on the stationary-phase volume inside the column and on its liquid–liquid distribution ratio K_D , also called the partition coefficient:

$$V_r = V_m + K_D V_s = V_C + (K_D - 1)V_s \quad (2)$$

The ability of a given CCC machine to retain a volume V_s of stationary phase is studied using the variable S_f :

$$S_f = V_s / V_C \quad (3)$$

S_f is most often expressed as a percentage of the column volume. This variable has no equivalent in other

chromatographic techniques that have a constant stationary-phase volume.

Results and discussion

The critical effect of S_f , the stationary-phase retention ratio

The S_f ratio is called the stationary-phase retention ratio. This variable is critical in CCC because no separation is possible if no liquid stationary phase is retained in the CCC column [5, 6, 9]. S_f is a dimensionless relative variable giving the percentage of the CCC column occupied by liquid stationary phase. It enables comparison of the stationary-phase retention abilities of different CCC columns.

The chromatographic resolution factor, R_s , is another dimensionless value quantifying the quality of the separation between two peaks, e.g. 1 and 2. R_s is defined as the retention difference between the two peaks divided by the average peak width at base, W . R_s is directly related to S_f by:

$$R_s = \frac{V_{r2} - V_{r1}}{\left(\frac{W_2 + W_1}{2} \right)} = S_f \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{K_{D2} - K_{D1}}{1 - S_f \left[1 - (K_{D2} + K_{D1})/2 \right]} \quad (4)$$

in which N , expressed in plate number, is the column efficiency [9]. Equation 4 reveals that it is very important to have good stationary-phase retention, S_f , because this variable acts directly on resolution even if a high efficiency, N , is also increasing resolution.

The S_f ratio is also used, for a single apparatus, to study the experimental factors affecting liquid-stationary-phase retention in the CCC column. S_f depends on variables including the magnitude of the centrifugal field expressed as rotor rotation speed, the mobile-phase flow rate, the coiled tube internal diameter for hydrodynamic CCC columns, and, especially, the nature and composition of the liquid system used [4–6, 10, 11]. It has been established that one of the most important physico-chemical variables for the biphasic liquid system is the density difference between the upper and lower phases [4–6]. Because gravitational or centrifugal forces are the only ones responsible for liquid-stationary-phase retention, a large density difference between phases will best enable a good stationary-phase-retention ratio.

Countercurrent chromatography with limonene AZ compositions

The objective of a good separation in CCC is to achieve an acceptable resolution factor, knowing that the 1.5 value for R_s

corresponds to baseline return between peaks (complete separation). Equation 4 reveals that the resolution factor depends on

1. the amount of liquid stationary phase present in the CCC column, factor S_f ;
2. the difference in solute partition coefficients, K_D , between the two solutes; and
3. the column efficiency, N .

Liquid-stationary-phase retention by a hydrodynamic CCC column

In a recent work, we revealed that the use of limonene in CCC significantly affected the density difference between the two liquid phases, which is the important variable for liquid-stationary-phase retention by the CCC column [1]. A minimum density difference of 0.05 g mL^{-1} was required to obtain some retention of the apolar limonene phase by the polar aqueous phase in a hydrodynamic CCC column [1]. The driving mobile-phase pressure was linked to density difference for hydrostatic CCC columns [1, 5, 6, 11].

Table 1 lists the experimental results obtained with the two types of CCC column for several “green” AZ compositions. Figures 1 and 2 show selections of the corresponding chromatograms obtained with three GUESS (generally useful estimate of solvent system [12]) solutes: new coccine red, aspirin, and coumarin. New coccine red, also called Ponceau 4R or C.I. Acid red 18, is a trisodic naphthylazo salt, which is unretained with all lower-phase aqueous mobile phases and is a very convenient brightly colored dead-volume marker in descending head-to-tail configuration. The pink color indicating the dye elution is clearly visible, making possible reliable and accurate dead-volume measurements and hence accurate determination of the liquid-phase volumes present in the CCC columns.

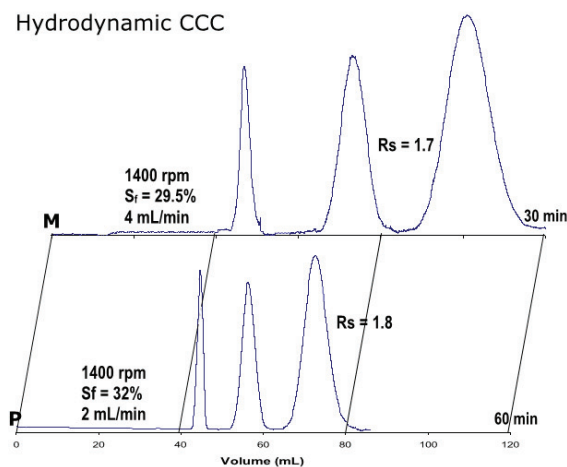
The results obtained with the limonene–methanol–water liquid system were fully confirmed [1]. The hydrodynamic column cannot retain the organic stationary phase if the phase-density difference is too low. At 1400 rpm, the Spectrum generates a maximum centrifugal field of approximately 3000 m s^{-2} or $300g$. The mixing and decantation steps needed for hydrodynamic stationary-phase retention require a specific difference in liquid-phase densities to enable the process to occur [4–6]. A minimum 0.05 g mL^{-1} density difference was found necessary to obtain workable stationary-phase retention with the Spectrum CCC column [1]. This density difference is achieved with composition Q (limonene–ethyl acetate–ethanol–water 3:2:3:2 (v/v)) of the “green” AZ system [3]. Compositions with a limonene content greater than that of composition P (limonene–ethyl acetate–ethanol–water 6:5:6:5 (v/v)) cannot be used with our hydrodynamic CCC column because the density difference between the two organic and aqueous phases is too low, with $\Delta d < 0.05 \text{ g mL}^{-1}$. As listed in Table 1,

Table 1 Organic-stationary-phase retention of selected “green” AZ liquid-system compositions by two CCC columns and corresponding chromatographic data

Liquid system	Δd (g mL ⁻¹)	Rotor (rpm)	Flow (mL min ⁻¹)	Pressure drop (kg cm ⁻²)	S_f (%)	V_r aspr (mL)	K_D aspr	N aspr	V_r coum (mL)	K_D coum	N coum	R_s
Hydrodynamic Spectrum CCC 67.5 mL column, Fig. 1												
M	0.075	1400	2.0	0.9	43	78.0	1.34	600	118	2.73	350	2.1
M	0.075	1400	4.0	1.0	29.5	74.4	1.34	650	102	2.73	380	1.7
P	0.060	1400	2.0	0.9	32	57.0	0.53	1200	72.5	1.25	700	1.8
P	0.060	1400	4.0	1.0	20	61.0	0.53	1500	71.0	1.25	900	1.3
R	0.040	1400	2.0	0.9	0	67.5	0.30*	—	67.5	0.71*	—	0.0
Hydrostatic Kromaton FCPC-C (R2D2) 35 mL column, Fig. 2												
M	0.075	2000	4.0	30	38	38.0	1.30	290	54.5	2.60	240	1.4
M	0.075	3000	5.0	47	36	37.5	1.29	350	54.0	2.60	270	1.6
P	0.060	3000	3.0	44	65	24.0	0.53	230	39.5	1.25	200	1.8
P	0.060	3000	4.5	42	48	26.5	0.53	340	38.0	1.25	300	1.6
R	0.040	2000	3.0	23	54	21.2	0.30	160	29.0	0.71	90	0.8
R	0.040	2300	4.0	34	55	21.0	0.30	200	29.0	0.71	130	1.0
U	0.019	3000	2.0	14	46	22.5	0.25	200	30.0	0.74	120	0.9
U	0.019	3000	4.0	18	35	25.0	0.25	180	31.0	0.74	100	0.6

 Δd : density difference between the two liquid phases S_f : liquid stationary phase retention factor ($=V_s/V_C$) V_r : retention volume of aspr, aspirin and coum, coumarin K_D : distribution constant or partition coefficient. The starred (*) values were taken from the hydrostatic experiment N : peak efficiency in plate number R_s : resolution factor between the aspr and coum peaks

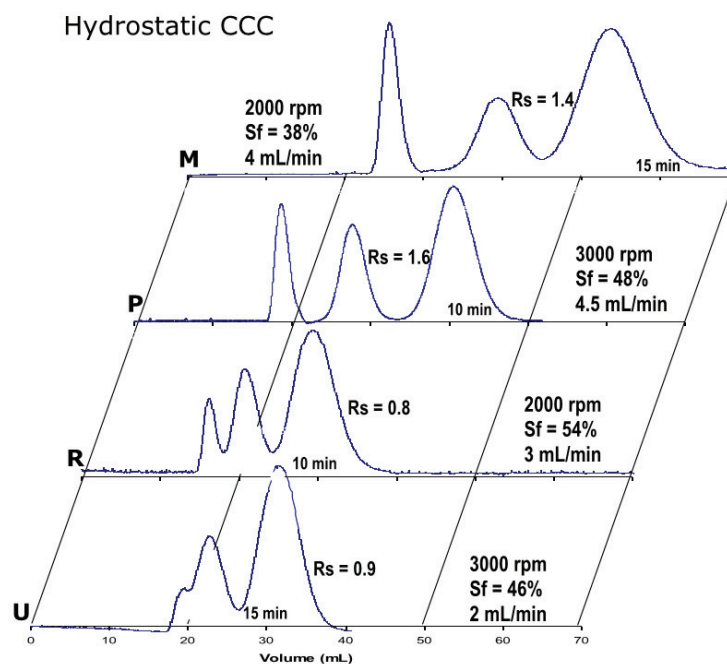
Hydrodynamic CCC

**Fig. 1** Separation of new, coccine red (first peak, 0.6 g L⁻¹), aspirin (second peak, 5.7 g L⁻¹), and coumarin (last peak, 1.2 g L⁻¹) with compositions M and P of the limonene–ethyl acetate–ethanol–water biphasic liquid system. Column hydrodynamic Spectrum (dynamic extraction), one bobbin 67.5 mL. Limonene–ethyl acetate–ethanol–water (v/v) solvent compositions: M: 5:6:5:6 and P: 6:5:6:5. S_f and R_s factors, rotor rotation speed, and aqueous mobile-phase flow rates in the descending mode are listed on the figure. All other experimental variables are listed in Table 1

the R composition (2:1:2:1 (v/v)), with Δd of 0.04 g mL⁻¹, achieved no organic-stationary-phase retention ($S_f=0$) at 1400 rpm and 2 mL min⁻¹ flow of aqueous phase in the descending head-to-tail direction. All compounds injected elute at the same retention volume: the CCC column volume ($V_s=0$; $V_r = V_C$ for all K_D , Eq. 2).

The more polar compositions M and P have phase-density differences higher than 0.05 g mL⁻¹ and can be used with the hydrodynamic CCC column. The amount of retained liquid stationary phase is clearly dependent on the phase-density difference, as predicted by the Wood equation [13]. Using the same centrifugal field of 1400 rpm (300g) and flow of 2 mL min⁻¹, 43 % of the organic stationary phase was retained with composition M (5:6:5:6 (v/v), $\Delta d=0.075$ g mL⁻¹), whereas only 32 % was retained with the similar composition P (6:5:6:5 (v/v), $\Delta d=0.06$ g mL⁻¹) (Table 1). Figure 1 compares the chromatograms obtained for the hydrodynamic CCC column with the two M and P compositions at 1400 rpm. With 30 % phase retention, baseline separation of aspirin and coumarin ($R_s=1.7$, Table 1) was obtained in less than 30 min (Fig. 1, top) at 4 mL min⁻¹ flow. It was possible to obtain a chromatogram at 4 mL min⁻¹ with the P composition and the same 300g centrifugal field, but S_f was only 20 %, too low to produce a baseline separation of the two retained solutes ($R_s=$

Fig. 2 Separation of new coccine red (first peak, 0.6 g L^{-1}), aspirin (second peak, 5.7 g L^{-1}), and coumarin (last peak, 1.2 g L^{-1}) with different compositions of the limonene–ethyl acetate–ethanol–water biphasic liquid system. Column hydrostatic Kromaton FCPC-C (R2D2) 35 mL. Limonene–ethyl acetate–ethanol–water (v/v) solvent compositions: M: 5:6:5:6; P: 6:5:6:5; R: 2:1:2:1; U: 4:1:4:1. Aqueous-phase mobile-phase flow rates in the descending mode and rotor rotation speeds are listed on the figure. Injection volume: 1 mL mobile phase. All experimental variables are listed in Table 1



1.3, Table 1). Figure 1 shows the baseline separation obtained at the lower 2 mL min^{-1} flow, for which $S_f=32\%$ and $R_s=1.8$ (Table 1). 40 min was needed to develop the 2 mL min^{-1} chromatogram.

Liquid-stationary-phase retention by a hydrostatic CCC column

Table 1 and Fig. 2 present the results obtained with the 35 mL hydrostatic CCC column. In the hydrostatic design, the liquid stationary phase is retained in physical chambers interconnected by ducts [9, 11]. This design contains a simpler rotor with a single rotation axis and constant centrifugal field, as compared with the rotor-holding bobbins with two axes and planetary motion of the hydrodynamic CCC columns. It also enables better retention of the liquid stationary phase. There were no problems with using any of the biphasic compositions of the “green” AZ liquid system. At 3000 rpm the FCPC-C R2D2 is able to generate a centrifugal field of approximately $300g$. The interconnecting ducts contain only the mobile phase, and a hydrostatic pressure is generated in front of each chamber containing the other immiscible phase. This pressure depends on the stationary-phase height in the chamber, the centrifugal field, and the phase-density difference, $\Delta\rho$ [1, 6, 11]. The total pressure drop, ΔP , needed to make the mobile phase percolate through the stationary phase is given by:

$$\Delta P = A\Delta\rho\omega^2 S_f + B\mu_M F \quad (5)$$

in which ω is the rotor rotation speed, S_f is the liquid-stationary-phase retention ratio, μ_M is the mobile-phase viscosity, F is the mobile-phase flow rate, and A and B are apparatus geometrical constants [11]. Equation 5 shows that the pressure drop increases quadratically with the rotor rotation speed. The high weighting of the first term, the hydrostatic term, in the pressure-drop Eq. 5 gives this column type its hydrostatic name. The second term is related to mobile-phase viscosity and flow rate (Darcy law), and can be called the hydrodynamic term.

The pressure drop in CCC columns is an important technical problem. Hydrostatic CCC columns need two rotating seals at column entrance and exit. These rotating seals have a nominal maximum working pressure that should not be exceeded, or leaks will occur. Centrifugal field and S_f stationary-phase retention are related. High centrifugal fields (high rotor-rotation speeds) enable good stationary-phase retention and hence large S_f . A low phase-density difference is thus a substantial advantage when working with hydrostatic CCC columns: it produces reduced pressure drops, enabling use of higher centrifugal fields (Table 1). Figure 2 shows the chromatograms obtained with different “green” AZ compositions and different experimental conditions. The chromatographic data are all listed in Table 1. The major differences between the Figs. 1 and 2 experiments are:

1. experiment duration: the smaller volume of the hydrostatic CCC column (34 mL) enables separation completion in less than 15 min;

- liquid-stationary-phase retention: the tighter holding of the organic limonene phase by the hydrostatic column enables use of the column with all AZ biphasic systems;
- driving mobile-phase pressure: a hydrodynamic CCC column has been described as a constant pressure column [13], needing a pressure drop of approximately 1 kg cm^{-2} or 100 kPa for 4 mL min^{-1} flows compared with the $20\text{--}50 \text{ kg cm}^{-2}$ or $2\text{--}5 \text{ MPa}$ pressure drops needed by the hydrostatic CCC column, depending on rotor rotation speed (Table 1).

The changes in resolution factors are caused by different column efficiency (Table 1), and especially by changes in the solute partition coefficients that determine peak position (Eq. 2).

Liquid-system polarity, partition coefficient, and peak position

The initial AZ scale was developed to obtain a regular polarity change between the very polar ethyl acetate–water biphasic system A and the low polarity heptane–methanol system Z [2]. Change in polarity is associated with change in solute-distribution constant K_D . In several biphasic-liquid-system scales, linear relationships between the logarithms of solute-partition coefficients and phase composition have been established [5, 6]. Such a linear relationship was found for the GUESS solutes in the standard heptane-based AZ system [12, 13]. The “green” AZ system was compared with the standard one using two solutes: aspirin and coumarin. Table 1 lists the experimentally determined solute K_D for the “green” AZ compositions.

Figure 3 reveals that the linearity of the $\log K_D$ values is excellent when plotted against the ethanol content of the organic stationary phase. A similar linear relationship was observed for the standard AZ liquid system and methanol content. However, the positions of the four proportions M, P, R, and U and the slopes of the lines are very different. This is caused by the significantly higher partition of ethanol in the two liquid phases of the limonene “green” compositions compared with the weak methanol partitioning in the upper organic phases of the heptane AZ scale [3]. The chemical analysis and physico-chemical study found that ethanol is so miscible with limonene that the Y and Z proportions are clear single phases [3]. More ethanol in the upper phase means a more polar organic phase. Considering the aspirin and coumarin partition-coefficient shifts, the “green” AZ compositions with limonene and ethanol can be regarded as one or two letters in the AZ scale more polar than the corresponding standard AZ compositions with heptane and methanol. For example, the limonene-based R composition gives aspirin and coumarin K_D values of 0.30 and 0.71, respectively (log values are -0.52 and -0.15 , respectively; Table 1). The heptane-based

corresponding R values are reduced by approximately a factor of two: 0.17 and 0.28 (log values are -0.77 and -0.55 , respectively) [14]. The corresponding values are 0.36 and 0.68 (log values -0.44 and -0.17 , respectively) for the more polar heptane-based P composition [14]. For these two molecular compounds, it can be assumed that the polarity of the R “green” AZ system is similar to that of the P standard AZ system.

Figures 1 and 2 show the changes in selectivity and resolution factors observed with composition changes. The K_D distribution constants depend on the liquid-system composition and not on the CCC column used. Table 1 shows small differences in the listed K_D values corresponding to the same AZ proportions. These minor differences are caused by experimental variations: small composition changes and temperature differences. The peak positions depend on K_D and also on the amount of each mobile and stationary phase in the CCC column (Eq. 2). Equation 4 shows that the resolution factor is primarily affected by the volume of stationary phase retained in the column (Table 1 and S_f).

Column efficiency

The R_s factor also depends on column efficiency. The plate number is related to the solute–stationary phase exchange kinetics. A faster and better exchange produces sharper peaks associated with a higher plate count. Table 1 lists efficiencies three to eight times higher for the hydrodynamic column than for the hydrostatic one. It must be taken into account that the hydrodynamic column used is almost twice the volume of the hydrostatic column (67.5 mL versus 35 mL). However, even doubling the plate number obtained with the hydrostatic column, the hydrodynamic column is still more efficient.

Figure 4 shows the composition M and P chromatograms of Figs. 1 and 2 represented in relative volume V/V_C to compensate for column-volume differences. The top figure shows the composition M chromatograms, both with very similar S_f factors (29.5 % and 30 %, Table 1). Combining Eqs. 2 and 3, the V/V_C ratio is given by:

$$V_r/V_C = 1 + (K_D - 1)S_f \quad (6)$$

If the S_f factors are the same for two experiments performed in two different columns with the same liquid system, then the same compounds should be located at the same relative retention volumes, providing clear evidence of efficiency differences. This is illustrated by the top image in Fig. 4, which shows much sharper peaks for the hydrodynamic chromatogram. The higher efficacy of hydrodynamic CCC columns is a known advantage of the hydrodynamic design in which there is continuous contact between the mobile and the stationary phase, meaning the solutes can exchange between phases without “dead” volume inside the CCC hydrodynamic

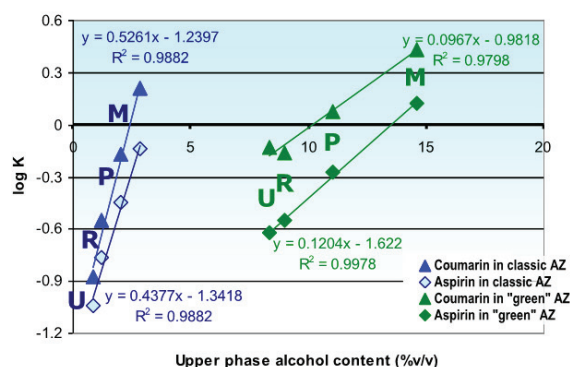


Fig. 3 Relationships between $\log K_D$ of coumarin (triangles) and aspirin (lozenges) and the alcohol content of the organic stationary phase. *Left lines:* heptane–ethyl acetate–methanol–water standard Arizona compositions and data from [14]. *Right lines:* limonene–ethyl acetate–ethanol–water “green” Arizona compositions (Table 1)

column [4–6]. In contrast, the chambers of the hydrostatic CCC column are interconnected by ducts that contain only mobile phase [4–6, 11]; the duct volume inside the hydrostatic

column is a chromatographic “dead” volume. For our hydrostatic column, this “dead” volume was close to one third of the column volume.

However, efficiency is not sufficient to obtain chromatographic resolution; stationary-phase retention is a critical variable. If a CCC column cannot retain a sufficient amount of liquid stationary phase, the resolution factor will be low (Eq. 4). This is illustrated by the bottom image in Fig. 4. For composition P, with a low 0.06 g mL^{-1} phase-density difference, the hydrodynamic Spectrum column can only retain 33 % of the liquid stationary phase at the reduced flow of 2 mL min^{-1} . The hydrostatic FCPC-C column can retain 48 % of the stationary phase at 4.5 mL min^{-1} . The 1200-plate efficiency of the hydrodynamic Spectrum column provides a similar resolution factor to the 340-plate efficiency of the hydrostatic FCPC-C column, because the weight of the S_f factor is higher than that of the plate number N (Eq. 4). It must however be pointed out that the hydrodynamic chromatogram lasted 50 min at 2 mL min^{-1} , whereas the hydrostatic one took only 12 min at 4.5 mL min^{-1} (Figs. 1 and 2).

Conclusion

Substituting limonene for heptane and ethanol for methanol in the standard scale of compositions of the heptane–ethyl acetate–methanol–water biphasic liquid system gives a greener biphasic system that has important differences from the original one. The first major difference is polarity. Partitioning of ethanol between the two liquid phases is much better than the partitioning of methanol, which mostly stays in the lower aqueous phase. This makes the organic limonene-rich phase more polar than the corresponding composition of the standard system, and causes significant changes in solute distribution constants. A rough estimate of polarity differences between the two liquid systems is that there is a one-to-two-letter unit difference between the “green” limonene system, the most polar, and the standard heptane-based system. Also, the least polar compositions of the standard heptane system, X, Y, and Z, with a water content of 5 % (v/v) or less, do not exist in the single-phase “green” limonene–ethanol system.

The second major difference between the two solvent scales is the density difference between phases. The density of limonene is much higher than that of heptane, producing phase-density differences of less than 0.06 g mL^{-1} for half of the “green” system compositions. This is a serious problem for hydrodynamic CCC

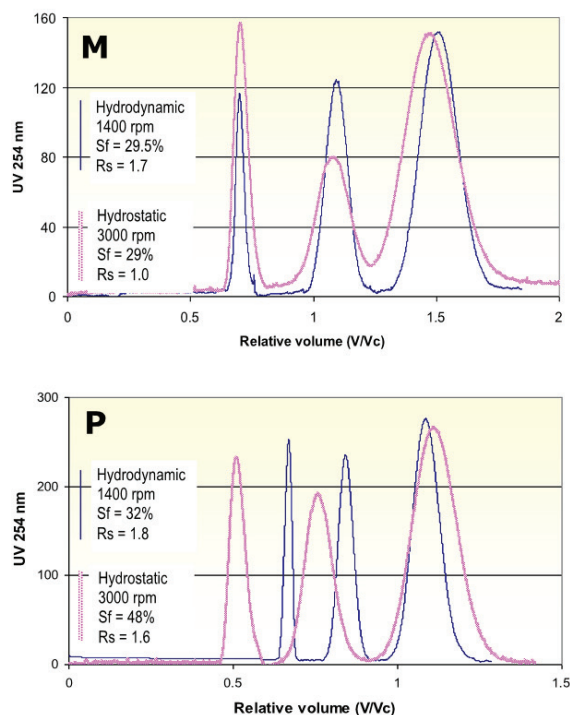


Fig. 4 Comparing chromatograms in relative volume scale. *Full thin lines:* hydrodynamic CCC column Spectrum (dynamic extraction) 67.5 mL. *Thick dotted lines:* hydrostatic CCC column FCPC-C R2D2 (Kromaton) 35 mL. *Top:* composition M: limonene–ethyl acetate–ethanol–water 5:6:5:6 (v/v). *Bottom:* composition P: 6:5:6:5 (v/v). First peak: coccine red (0.6 g L^{-1}), a dead volume marker; second peak: aspirin (5.7 g L^{-1}); last peak: coumarin (1.2 g L^{-1}). Injection of 1 mL in the aqueous mobile phase

columns that require a minimum phase-density difference to be able to retain a workable amount of liquid stationary phase: only the polar A to P “green” limonene-based compositions can be used with hydrodynamic CCC columns. In contrast, the low density difference is an advantage with hydrostatic CCC columns where this difference is responsible for the mobile-phase driving pressure. Working with maximum centrifugal fields to obtain substantial amounts of retained stationary phase is possible with hydrostatic columns for all A to W compositions of the “green” limonene-based liquid system.

Chromatographic resolution factors also depend on column efficiency: the highest efficiency is desirable when there is a sufficient amount of stationary phase retained by the CCC column. The potential of the “green” limonene-based liquid system has been proved for CCC. The fruity, pleasant odor of the compositions is a final advantage that must be mentioned.

Acknowledgments KF and AB thank the French Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS ISA UMR5280) for continuous support and Rousselet Centrifugation (Annonay, France) for the loan of a hydrostatic FCPC-D Kromaton apparatus. EB thanks Rousselet Centrifugation for a three-year CIFRE PhD grant.

References

1. Faure K, Bouju E, Suchet P, Berthod A (2013) *Anal Chem* 85:4644–4650
2. Margraff R (1994) In: Foucault A (ed) *Centrifugal partition chromatography, chromatographic science series*, vol 68. Marcel Dekker, New York, pp 331–350
3. Faure K, Bouju E, Suchet P, Berthod A (2014) submitted article
4. Mandava B, Ito Y (1988) *Countercurrent chromatography, theory and practice, chromatographic science Ser. vol. 44*. Marcel Dekker, New York
5. Conway WD (1990) *Countercurrent chromatography, apparatus, theory & applications*. VCH Publishers, Weinheim
6. Berthod A (2002) *Countercurrent chromatography, the support-free liquid stationary phase, Comprehensive analytical chemistry*, vol. 38. Elsevier, Amsterdam
7. Freisen JB, Pauli GF (2007) *J Chromatogr A* 1151:51–59
8. Sutherland IA, Fisher D (2009) *J Chromatogr A* 1216:740–753
9. Faure K, Mekaoui N, Meucci J, Berthod A (2013) *LC/GC N Am* 31: 132–143
10. Zhang M, Ignatova S, Hu P, Liang Q, Wang Y, Luo G, Sutherland IA (2011) *J Chromatogr A* 1218:6031–6037
11. Foucault A (1994) *Centrifugal partition chromatography, chromatographic science series*, Vol. 68. Marcel Dekker, New York
12. Friesen JB, Pauli GF (2005) *J Liq Chromatogr Rel Technol* 28:2777–2806
13. Wood PL, Hawes D, Janaway L, Sutherland IA (2003) *J Liq Chromatogr Rel Technol* 26:1373–1396
14. Lu Y, Berthod A, Hu R, Ma W, Pan Y (2009) *Anal Chem* 81:4048–4059

3.2.2.2. Conclusion

Le système Arizona est un système composé de 4 solvants mélangés en 23 proportions initiales différentes numérotées de A à Z. Deux types de système solvant Arizona sont testés ici : le système Arizona classique composé d'heptane, d'acétate d'éthyle, de méthanol et d'eau et le système Arizona vert, dont l'heptane a été remplacé par du limonène et le méthanol par de l'éthanol, tous deux d'origine bio-sourcée. Le système Arizona est un système solvant permettant de balayer de manière linéaire toute une gamme de polarité, comme en témoigne la variation des coefficients de partage de l'aspirine et de la coumarine en fonction de la proportion initiale en solvants. Ce propos est constaté autant sur le système Arizona classique que sur le système Arizona vert.

La mesure des coefficients de partage des solutés testés dans cet article permet également de constater, à proportions initiales constantes, que les systèmes solvant Arizona classique et vert comportent une différence de polarité entre eux. En effet, le système vert apparaît plus polaire que le système classique, mettant en évidence une différence d'une à deux lettres entre eux. Par conséquent, un système solvant Arizona vert R correspond, en termes de polarité, à un système solvant Arizona classique P. Le système Arizona M classique utilisé lors de la mise en place de la méthodologie de scale-up se situe quant à lui entre un Arizona vert M et un Arizona P vert.

Il est possible d'utiliser le système solvant Arizona vert en système hydrodynamique mais uniquement dans la gamme de polarité comprise entre les lettres A et P. Dans ce cadre-là, les systèmes M et P ont pu être testés avec succès, apportant un taux de phase stationnaire compris entre 20 et 45 %, permettant ainsi la séparation des trois solutés test new coccine red, aspirine et coumarine. Ces valeurs permettent de confirmer les propos annoncés dans les deux articles précédents (26, 27) : tant que la différence de densité entre les deux phases du système est supérieure à 0,05, il est possible de retenir un minimum de phase stationnaire sur système hydrodynamique. En dessous de cette valeur, la phase stationnaire ne peut être retenue, comme ceci est le cas pour les systèmes solvant plus riches en limonène que le système solvant Arizona P. De plus, il a été constaté lors des expériences réalisées dans le cadre de cet article que plus la différence de densité est grande, plus le taux de phase stationnaire est important.

Les essais en systèmes hydrostatique ont permis de montrer qu'il était possible de retenir la phase stationnaire de tous les systèmes Arizona vert comportant deux phases (de A à W), quel que soit la valeur de la différence de densité. La faible différence de densité entre les phases supérieures et inférieures apparaît même être un avantage pour les systèmes hydrostatiques puisqu'elle permet de n'engendrer que très peu de pression au sein de la colonne et donc d'apporter une force centrifuge maximale. Comme montré dans la publication précédente (27), les systèmes X, Y et Z ne comportent qu'une seule phase et sont donc inutilisables.

L'utilisation du système solvant Arizona vert permet également de constater des différences entre les appareillages de types hydrodynamique et hydrostatique. Tout d'abord, sur les systèmes hydrostatiques, il est possible pour l'utilisateur de travailler à des débits beaucoup plus rapides que sur les systèmes hydrodynamiques, engendrant des durées de séparation beaucoup plus faibles. De plus, à polarité donnée, le taux de phase stationnaire apparaît beaucoup plus important en système hydrostatique, tandis que les systèmes hydrodynamiques possèdent l'avantage d'être beaucoup plus efficaces. Le taux de phase stationnaire et l'efficacité ayant tous deux une grande importance dans la résolution entre les pics chromatographiques, les deux types d'appareillage se valent donc et permettent d'avoir une résolution équivalente entre les pics d'aspirine et de coumarine.

L'utilisation du système solvant Arizona vert s'avérant possible en CPC, nous avons choisi pour la suite de le valoriser. La purification du carnosol sera ainsi réalisée non plus avec des solvants pétroliers mais avec des solvants verts, en remplaçant les solvants problématiques par d'autres solvants plus respectueux de l'Homme et de l'environnement.

3.3. Application du système solvant Arizona vert à la purification du carnosol

Au cours du chapitre 2, nous avons pu développer une méthode de purification du carnosol provenant d'un extrait éthanolique de romarin, que nous avons pu monter ensuite en échelle au cours du chapitre 3. Cependant, cette méthode de purification, bien qu'économique car réalisée à l'aide de solvants peu chers reste peu écologique puisque deux solvants, l'heptane et le MTBE sont issus de ressources fossiles. Ainsi, il peut être intéressant de redévelopper une nouvelle méthode en privilégiant des solvants verts et/ou d'origine bio-sourcée, plus écologiques et bien souvent moins toxiques pour l'homme.

Dans cette section, nous nous proposons donc de remplacer le système solvant heptane/MTBE/éthanol/eau par le système Arizona vert (limonène/acétate d'éthyle/éthanol/eau) développé au préalable dans les publications (27) et (28). En effet, nous avons pu montrer précédemment que le limonène possédait une polarité quasi-équivalente à celle de l'heptane ($\log P_{o/w} \text{ limonène} = 4,58$ et $\log P_{o/w} \text{ heptane} = 4,50$) et que les diagrammes ternaires heptane/méthanol/eau et limonène/méthanol/eau étaient similaires (26, 27). Concernant les polarités du MTBE et de l'acétate d'éthyle, celles-ci sont relativement similaires puisque le $\log P_{o/w} \text{ MTBE}$ est de 0,94 (32) tandis que le $\log P_{o/w} \text{ acétate d'éthyle}$ est de 0,78 (27). Foucault montre notamment dans son livre que ces deux solvants peuvent être utilisés dans des systèmes solvants de polarités proches tel qu'illustré par la comparaison des diagrammes ternaires MTBE/acétonitrile/eau et acétate d'éthyle/acétonitrile/eau, tous deux de polarité intermédiaire (10). L'acétate d'éthyle faisant partie de la liste des solvants verts selon Aubry et al. (2) (Tableau 26), il apparaît donc comme une bonne alternative au MTBE.

Afin de choisir le système solvant Arizona vert approprié, c'est-à-dire dans les bonnes proportions, des shake-flasks seront dans un premier temps réalisés. Un test de purification par CPC sera ensuite effectué avant d'analyser les fractions récoltées par HPLC afin d'estimer la pureté du carnosol collecté.

3.3.1.1. *Shake-flasks*

Des shake-flasks sont dans un premier temps réalisés sur deux systèmes solvant Arizona vert choisis dans une gamme de polarité intermédiaire : le système Arizona vert N, composé de limonène/acétate d'éthyle/éthanol/eau en proportions 1/1/1/1 (v/v) et le système Arizona vert P, composé de limonène/acétate d'éthyle/éthanol/eau en proportions 6/5/6/5 (v/v) (Figure 59). Les coefficients de partage des solutés présents sur les chromatogrammes sont calculés pour chaque système solvant afin de pouvoir estimer la séparation entre le carnosol et les autres impuretés (Tableau 29 et Tableau 30).

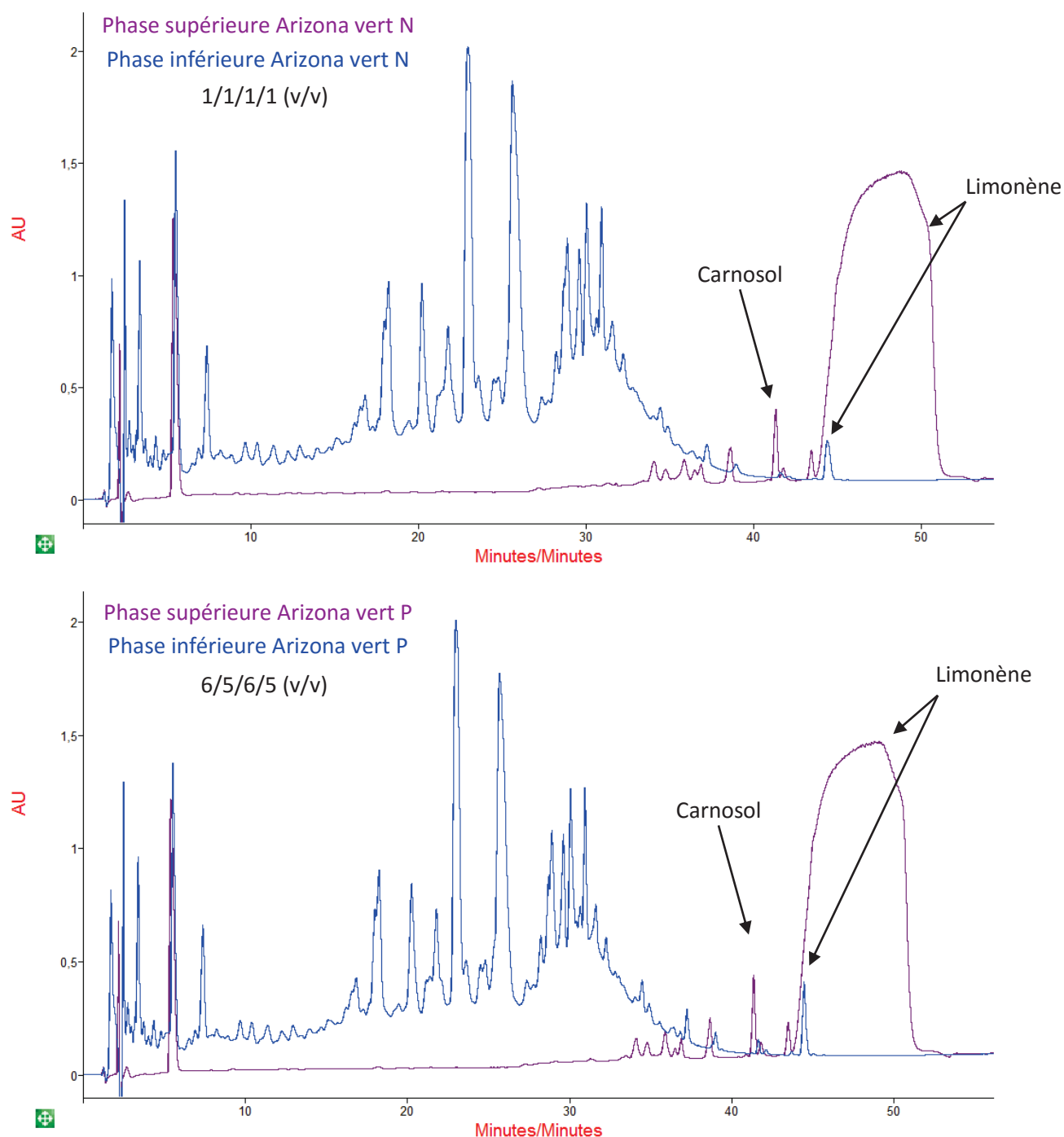


Figure 59 : Chromatogramme HPLC des phases supérieures et inférieures lors de shake-flasks sur les systèmes solvants Arizona vert N (haut) et P (bas). Conditions HPLC en chapitre 2.

L'observation de la Figure 59 montre que pour les deux systèmes solvant Arizona vert, seulement quelques composés dont le carnosol se partagent dans la phase supérieure. En calculant la valeur des coefficients de partage théorique, on observe que le système solvant le plus polaire (Arizona N) entraîne des coefficients de partage en mode descendant plus importants que le système solvant le moins polaire (Arizona P) (Tableau 29 et Tableau 30).

Tableau 29 : Résultats du shake-flask réalisé à l'aide du système solvant Arizona vert N. Les calculs de coefficient de partage sont réalisés pour une utilisation du système solvant en mode descendant (phase stationnaire supérieure).

Composé	Temps rétention (min)	Aire du pic en phase supérieure	Aire du pic en phase inférieure	Kd ^{théorique} (mode descendant)
	< 36,92			Kd < 1
	36,92	86,2	80,6	1,1
	38,68	177,3	45,8	3,9
Carnosol	41,37	275,0	23,6	11,6
	41,82	64,3	11,5	5,6
	43,50	102,3	7,4	13,9

Tableau 30 : Résultats du shake-flask réalisé à l'aide du système solvant Arizona vert P. Les calculs de coefficient de partage sont réalisés pour une utilisation du système solvant en mode descendant (phase stationnaire supérieure).

Composé	Temps rétention (min)	Aire du pic en phase supérieure	Aire du pic en phase inférieure	Kd ^{théorique} (mode descendant)
	< 38,68			Kd < 1
	38,68	109,9	49,8	2,2
Carnosol	41,37	259,9	38,3	6,8
	41,82	56,3	12,8	4,5
	43,50	105,9	8,7	12,2

Afin de vérifier cette tendance, des shake-flasks sont réalisés sur d'autres systèmes de la gamme Arizona vert. Les coefficients de partage du carnosol sont regroupés dans le Tableau 31. L'observation des résultats confirme bien que plus le système solvant est polaire, plus le coefficient de partage du carnosol est important.

Afin de pouvoir séparer le carnosol des autres impuretés de la matrice, il est important que son coefficient de partage théorique ne soit pas trop faible pour pouvoir le différencier des composés les plus polaires (temps de rétention compris entre 0 et 35 minutes lors de l'analyse HPLC). Il ne faut également pas que le coefficient de partage théorique du carnosol soit trop important afin de ne pas travailler sur des temps de purification trop longs. Enfin, le coefficient de partage du carnosol doit être assez éloigné des coefficients de partage des impuretés de polarité proche afin de pouvoir les séparer par CPC.

Tableau 31 : Valeur des coefficients de partage théoriques du carnosol sur différents systèmes solvant Arizona vert classés par polarité décroissante. Les calculs de coefficient de partage sont réalisés pour une utilisation du système solvant en mode descendant.

	Système solvant Arizona vert	Proportions (v/v)				Kd théorique Carnosol (mode descendant)
		Limonène	Acétate d'éthyle	Ethanol	Eau	
Polarité ↑	K	1	2	1	2	46,3
	L	2	3	2	3	17,5
	N	1	1	1	1	11,6
	P	6	5	6	5	6,8
	R	2	1	2	1	1,0
	T	3	1	3	1	0,7

Le système solvant Arizona vert P semble être celui qui comporte le meilleur compromis. En effet, le coefficient de partage du carnosol est assez différent des autres impuretés pour pouvoir le séparer ($K_d \text{ théorique carnosol} = 6,8$ contre des impuretés dont les coefficients de partage sont de 12,2 ; 4,5 ; 2,2 et < 1). Le système solvant Arizona vert N semble moins favorable car le coefficient de partage du carnosol devient beaucoup trop important ($K_d \text{ théorique carnosol} = 11,6$). Les systèmes plus apolaires tels que les systèmes Arizona vert R et T sont également à éliminer car ils ne permettent pas un coefficient de partage assez important du carnosol. Dans ces systèmes solvant, il est en effet ≤ 1 , ne permettant pas l'isolement du carnosol par rapport aux impuretés les plus polaires.

Le choix du système solvant ayant été réalisé, un essai de séparation des composants du romarin peut être réalisé à l'aide du système solvant Arizona P vert.

3.3.1.2. Injection CPC

Le système solvant Arizona vert P ayant été sélectionné lors des essais par shake-flask, ce dernier peut à présent être testé en CPC. Les conditions opératoires utilisées pour cette expérience sont de 3000 rpm et 3 mL/min, permettant un taux de phase stationnaire optimal de 65 %, conformément aux résultats obtenus dans la publication (28).

Une injection de 1 mL de la phase supérieure de la solution de romarin à 500 mg/mL dissoute dans 50% de phase supérieure et 50% de phase inférieure du système solvant Arizona vert P est réalisée. Le système de détection utilisé ici n'est pas un détecteur UV mais un détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL). En effet, le limonène absorbant à 210 nm, il est impossible de détecter le carnosol par spectrométrie UV, dont le maximum d'absorption se situe à cette même longueur d'onde. Le DEDL étant un détecteur destructif, un split est mis en place afin de pouvoir collecter 1 mL d'extrait par minute tandis que 2 mL est envoyé au DEDL par minute.

Le coefficient de partage théorique du carnosol calculé lors des shake-flasks en HPLC est de 6,8. Pour un taux de phase stationnaire de 65 %, le volume de rétention théorique est calculé à 167 mL soit un temps de rétention d'environ 56 minutes. Une collecte des fractions est ainsi réalisée toutes les deux minutes entre 0 et 65 minutes. Le chromatogramme issu de la séparation CPC est visible Figure 60.

On note qu'il existe un décalage entre la détection au DEDL et la collecte, la fraction 2 démarrant à $t = 1,4$ minute sur le chromatogramme CPC.

L'observation du chromatogramme montre de nombreux pics co-élusés entre 4 et 50 minutes. Aucun pic n'apparaissant aux alentours de 56 minutes, c'est l'injection HPLC de l'intégralité des fractions collectées en sortie de CPC qui permettra de mettre en évidence la présence ou non de carnosol entre les fractions 1 à 32.

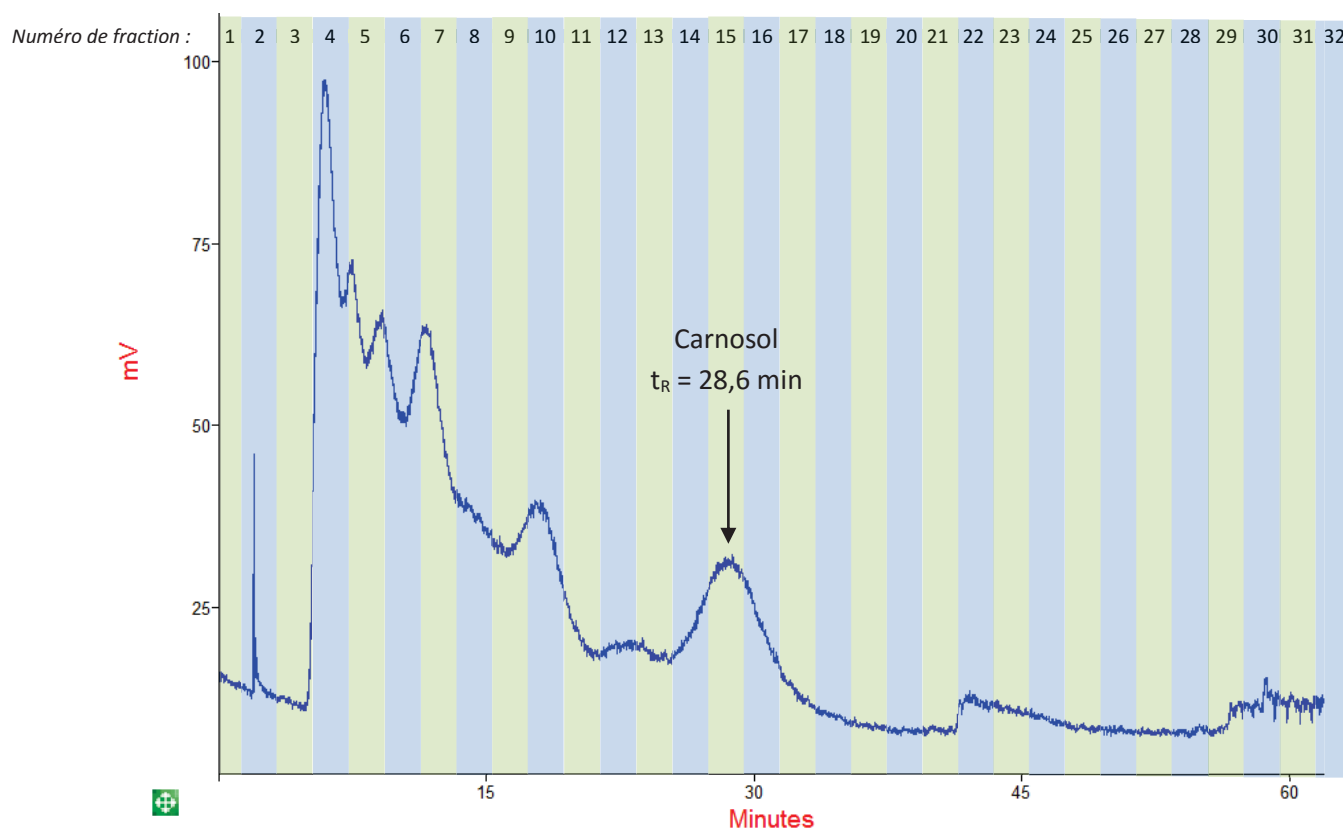


Figure 60 : Chromatogramme CPC de l'injection de 1 mL de phase supérieure de l'extrait de romarin à purifier préparé à 500 mg/mL dans 50% de phase supérieure et 50% de phase inférieure du système solvant Arizona vert P. Conditions opératoires : 3000 rpm, 3 mL/min, système solvant Arizona P mode descendant, détection DEDL température 100 °C, gain 1, Sf = 58 %, P = 55 bar. Les différentes fractions collectées sont représentées directement sur le chromatogramme.

3.3.1.3. Analyse HPLC

Les différentes fractions récoltées en sortie de CPC (Figure 60) sont analysées par HPLC (Figure 61). En réalisant la comparaison avec l'injection d'un standard de carnosol mais aussi en observant le spectre UV du pic HPLC situé à un temps de rétention de 41,6 minutes, on constate que le carnosol est détecté entre les fractions 13 et 18, soit entre 23,4 et 35,4 minutes. La fraction comportant le plus de carnosol est la fraction 15. Les informations révélées par l'analyse HPLC permettent de montrer que le carnosol se situe sur le chromatogramme CPC au niveau du pic dont le maximum se trouve à un temps de rétention de 28,6 minutes (Figure 60).

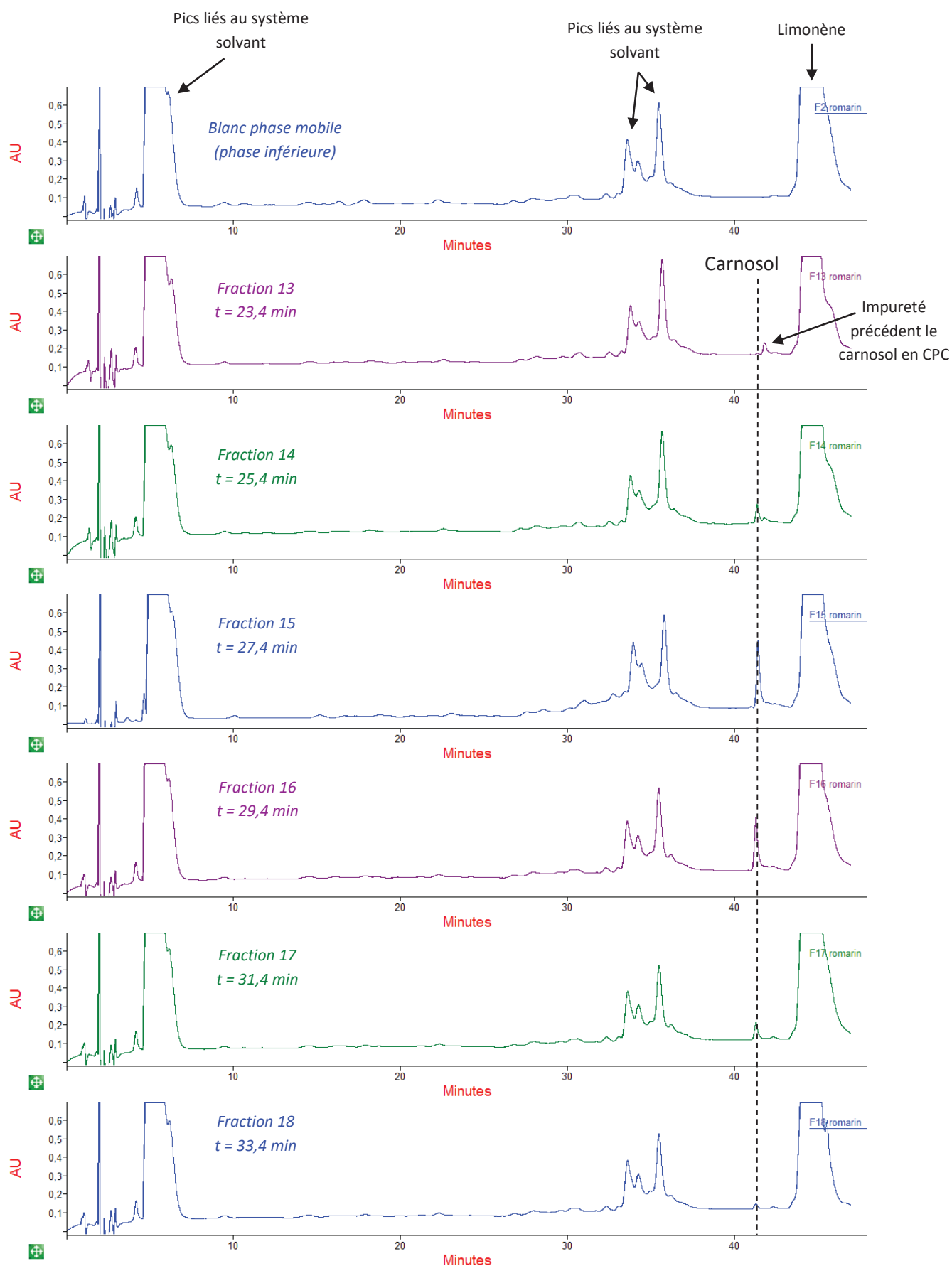


Figure 61 : Chromatogrammes HPLC des différentes fractions du romarin purifiées en CPC à l'aide du système solvant Arizona vert P en mode descendant à 3000 rpm, 3 mL/min. Conditions HPLC en chapitre 2.

En se basant sur le temps de rétention du pic le moins retenu en CPC, le taux de phase stationnaire contenu dans la colonne est calculé à 58 %, soit une quantité de phase stationnaire légèrement inférieure aux résultats obtenus dans la publication (28). Le maximum du pic chromatographique du carnosol en CPC se trouvant à 28,6 minutes, la valeur du coefficient de partage réel est calculée à 3,5. La différence entre le coefficient de partage théorique ($Kd_{\text{théorique}} = 6,8$) et la mesure du coefficient de partage expérimental ($Kd_{\text{expérience}} = 3,5$) peut s'expliquer par une légère perte de phase stationnaire (ou flooding) au cours de l'opération de CPC, sous-estimant alors le coefficient de partage mesuré lors de l'opération de purification du carnosol. Cette perte de phase stationnaire est en effet observée dans les tubes de collecte. Elle est probablement due à l'injection de l'échantillon, qui comme beaucoup d'extraits naturels peut provoquer la formation d'émulsions, empêchant le système biphasique de décanter correctement au sein de la colonne et par conséquent la bonne rétention de la phase stationnaire (33). La différence entre les valeurs des coefficients de partage théorique et expérimental pourrait également s'expliquer par le fait que le calcul du coefficient de partage par shake-flask ne permet de donner qu'une estimation. Même si la valeur théorique du coefficient de partage est souvent proche de la valeur réelle, une légère différence est souvent observée.

Les injections HPLC des différentes fractions CPC collectées peuvent être comparées au blanc de phase mobile CPC afin de mettre en évidence les impuretés provenant des différentes étapes de la purification (système solvant, préparation de l'échantillon à purifier, purification par CPC et/ou injection HPLC). Ainsi, l'observation des fractions 14 à 18 (Figure 61) permet de montrer que ces dernières ne comportent que du carnosol et des impuretés aussi retrouvées dans le blanc. Le carnosol a donc pu être isolé des autres impuretés contenues dans l'échantillon de romarin à purifier. Il sera essentiel de s'assurer que les impuretés du solvant disparaissent lorsque celui sera éliminé.

L'observation du chromatogramme CPC et l'analyse des fractions par HPLC permettent également de souligner la présence d'une co-élution entre le pic de carnosol et le pic précédent. Une impureté est en effet visible au niveau des fractions 12 et 13 en CPC ($t_{R \text{ impureté}} = 23$ minutes) et à un temps de rétention de 42 minutes en HPLC. La présence de cette impureté réduit légèrement le taux de récupération du carnosol pur. Cette co-élution pourrait probablement être évitée si la rétention du carnosol était augmentée avec un système solvant plus polaire tel que le système Arizona vert N, comme le montre le Tableau 31.

3.3.1.4. Conclusion

La purification du carnosol provenant d'un extrait de romarin a pu être réalisée par CPC à l'aide d'un système solvant vert alternatif au système solvant heptane/MTBE/éthanol/eau. Ce système solvant vert est composé de limonène, d'acétate d'éthyle, d'éthanol et d'eau en proportions 6/5/6/5 (v/v), également appelé système Arizona vert P. Cependant, même si les fractions de carnosol semblent pour la plupart pures, l'utilisation d'un système solvant légèrement plus rétentif pourrait permettre de séparer cette molécule d'intérêt de l'impureté précédente de manière plus nette afin d'approcher un taux de récupération de 100 %. Ainsi, un système solvant Arizona vert comportant légèrement moins de limonène et d'éthanol (plus polaire) tel que le système N pourrait être utilisé.

Le calcul du taux de phase stationnaire au sein de la colonne mais aussi du volume de rétention du carnosol lors de la purification par CPC nous a permis de calculer le coefficient de partage expérimental et de le comparer au coefficient de partage théorique déterminé lors de la réalisation des shake-flasks.

La différence entre les deux coefficients de partage peut s'expliquer par une estimation trop approximative du $Kd_{\text{théorique}}$ par shake-flask mais aussi par une perte de phase stationnaire continue lors de l'opération de purification (flooding), probablement liée à l'injection de l'échantillon, et sous-estimant la valeur réelle du Kd_{carosol} . Malgré cette différence entre les coefficients de partage, l'utilisation de shake-flasks apparaît essentielle car elle permet d'avoir une bonne estimation de la qualité de séparation des systèmes solvant avant de réaliser des essais directement en CPC, et donc d'user moins de solvants et d'échantillons que lors de la réalisation directe d'une purification par CPC.

6. Conclusion et perspectives

Dans ce chapitre, nous avons pu voir que dans l'objectif de travailler avec des solvants plus respectueux en CPC, il était possible de substituer des solvants d'origine pétrolière et toxiques pour l'homme et l'environnement par des solvants verts, souvent d'origine agro-sourcée. Ainsi à travers la présentation de trois publications, nous avons pu montrer que l'heptane était substituable par le limonène, un solvant issu des déchets de l'industrie des agrumes. Nous avons également pu remplacer le système solvant Arizona composé d'heptane, d'acétate d'éthyle, de méthanol et d'eau par un système solvant Arizona vert composé de limonène, acétate d'éthyle, éthanol et eau. Ces deux systèmes Arizona possèdent des propriétés légèrement différentes, telles que la différence de densité entre les phases supérieures et inférieures du système biphasique ou la polarité des phases. Ces différences engendrent des modifications de tenue de phase stationnaire sur systèmes hydrostatiques, appareils supportant mal les systèmes solvants à faible différence de densité, mais aussi une légère modification de la polarité du système, rendant un système Arizona P classique équivalent en termes de sélectivité à un système Arizona R vert.

Les résultats satisfaisants obtenus lors de la séparation de solutés tests à l'aide du système solvant Arizona vert en CPC (bon taux de phase stationnaire pour une pression faible) nous ont ensuite conduits à tester ce système en conditions réelles sur la purification du carnosol. La séparation, initialement réalisée à l'aide du système solvant heptane/MTBE/éthanol/eau, a ainsi pu être réalisée à l'aide du système solvant Arizona vert, en remplaçant l'heptane par du limonène et le MTBE par de l'acétate d'éthyle. En utilisant la méthode des shake-flasks, il a été possible de sélectionner une composition du système solvant Arizona vert appropriée, afin de séparer la molécule cible des impuretés de la matrice végétale. Dès lors, la purification a pu être réalisée par CPC en réutilisant les conditions opératoires préalablement déterminées lors des tests préliminaires présentés sur la publication. D'après les analyses HPLC des fractions récoltées en sortie de CPC ont pu montrer que cette molécule cible a pu être isolée de manière pure, avec seulement une légère co-élution en amont du pic de carnosol, diminuant le taux de récupération.

Une étude plus approfondie pourrait être envisagée afin d'améliorer la qualité de séparation du carnosol avec l'impureté précédente et afin d'améliorer le taux de récupération du carnosol. Pour cela, un système solvant plus rétentif pourrait être testé selon le développement de la méthode réalisée au cours du chapitre 2.

Références

1. L. Moity, T. Durand, A. Benazzouz, V. Molinier, J.-M. Aubry, in *Alternative Solvents for Natural Products Extraction*, F. Chemat, M. A. Vian, Eds. (Springer Berlin Heidelberg, 2014), chap. 1, pp. 1-24.
2. L. Moity, M. Durand, A. Benazzouz, C. Pierlot, V. Molinier, J.-M. Aubry, Panorama of sustainable solvents using the COSMO-RS approach. *Green Chemistry* **14**, 1132-1145 (2012).
3. F. M. Kerton, R. Marriott, in *Alternative Solvents for Green Chemistry*. (Royal Society of Chemistry, 2013), chap. 1, pp. 1-22.
4. M. Abert Vian, F. Chemat, L. Prat, C. Gourdon, in *Éco-extraction du végétal: procédés innovants et solvants alternatifs*, F. Chemat, Ed. (Dunod, 2011), chap. 1, pp. 1-26.
5. *Le guide de la chimie du végétal et des agro-ressources: les agro-ressources, les procédés, les bio-produits*. Chimedit, Ed., (2012).
6. M. Durand, V. Molinier, W. Kunz, J.-M. Aubry, Classification of Organic Solvents Revisited by Using the COSMO-RS Approach. *Chemistry – A European Journal* **17**, 5155-5164 (2011).
7. A. Klamt, F. Eckert, W. Arlt, COSMO-RS: An Alternative to Simulation for Calculating Thermodynamic Properties of Liquid Mixtures. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering* **1**, 101-122 (2010).
8. I. V. Berezovskaya, Classification of Substances with Respect to Acute Toxicity for Parenteral Administration. *Pharmaceutical Chemistry Journal* **37**, 139-141 (2003).
9. I. Koudous, W. Kunz, J. Strube, in *Green Extraction of Natural Products: Theory and Practice*, F. Chemat, J. Strube, Eds. (John Wiley & Sons, 2015), chap. 6, pp. 173-236.
10. A. P. Foucault, in *Centrifugal partition chromatography*, A. P. Foucault, Ed. (M. Dekker, 1995), chap. 4, pp. 71-97.
11. F. Oka, H. Oka, Y. Ito, Systematic search for suitable two-phase solvent systems for high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **538**, 99-108 (1991).
12. J. B. Friesen, G. F. Pauli, Rational development of solvent system families in counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **1151**, 51-59 (2007).
13. Y. Ito, Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **1065**, 145-168 (2005).
14. A. Berthod, M. Hassoun, M. J. Ruiz-Angel, Alkane effect in the Arizona liquid systems used in countercurrent chromatography. *Analytical and bioanalytical chemistry* **383**, 327-340 (2005).
15. INRS, Fiche toxicologique n°168 : Heptane. (2008).
16. D. Bégin, M. Gérin, in *Solvants industriels: santé, sécurité, substitution*, M. Gérin, Ed. (Masson, 2002), chap. 2, pp. 13-26.
17. INRS, Fiche toxicologique n°242 : MTBE. (2012).
18. D. J. C. Constable, C. Jimenez-Gonzalez, R. K. Henderson, Perspective on Solvent Use in the Pharmaceutical Industry. *Organic Process Research & Development* **11**, 133-137 (2007).
19. INRS, Fiche toxicologique n°5 : Méthanol. (2009).
20. INRS, Fiche toxicologique n°48 : Ethanol. (2011).
21. D. Ballerini, D. Casanave, A. Forestière, S. Lacombe, X. Montagne, in *Les Biocarburants*, D. Ballerini, Ed. (Editions Technip, 2006), chap. 2, pp. 79-135.
22. C. Ernenwein, V. Fréville, I. Pezron, in *Éco-extraction du végétal: procédés innovants et solvants alternatifs*, F. Chemat, Ed. (Dunod, 2011), chap. 7, pp. 169-205.
23. INRS, Fiche toxicologique n°18 : Acétate d'éthyle. (2011).
24. L. Petigny, M. Zafer Özel, S. Périno, J. Wajsman, F. Chemat, in *Green Extraction of Natural Products: Theory and Practice*, F. Chemat, J. Strube, Eds. (Wiley, 2015), chap. 7, pp. 237-263.
25. W. Nelson, in *Green Solvents for Chemistry : Perspectives and Practice*. (Oxford University Press, USA, 2003), chap. 4, pp. 91-115.

26. K. Faure, E. Bouju, P. Suchet, A. Berthod, Use of Limonene in Countercurrent Chromatography: A Green Alkane Substitute. *Analytical chemistry* **85**, 4644-4650 (2013).
27. K. Faure, E. Bouju, P. Suchet, A. Berthod, Limonene in Arizona liquid systems used in countercurrent chromatography. I Physicochemical properties. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **406**, 5909-5917 (2014).
28. K. Faure, E. Bouju, J. Doby, A. Berthod, Limonene in Arizona liquid systems used in countercurrent chromatography. II Polarity and stationary-phase retention. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **406**, 5919-5926 (2014).
29. INRS, Fiche toxicologique n°227 : Limonène. (2010).
30. M. Pourbafrani, G. Forgács, I. S. Horváth, C. Niklasson, M. J. Taherzadeh, Production of biofuels, limonene and pectin from citrus wastes. *Bioresource Technology* **101**, 4246-4250 (2010).
31. F. Chemat, N. Rombaut, S. Fabiano-Tixier, J. T. Pierson, A. Billy, in *Green Extraction of Natural Products: Theory and Practice*, F. S. Chemat, J., Ed. (Wiley, 2015), chap. 1, pp. 1-36.
32. D. R. Lide, in *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. (Taylor & Francis, 2008), pp. 16-42.
33. L. Marchal *et al.*, Rational improvement of centrifugal partition chromatographic settings for the production of 5-n-alkylresorcinols from wheat bran lipid extract: I. Flooding conditions—optimizing the injection step. *Journal of Chromatography A* **1005**, 51-62 (2003).

Conclusion générale et perspectives

Ces travaux de thèse ont permis d'aborder différents aspects de la chimie verte à travers la réalisation de la purification de produits naturels par chromatographie de partage centrifuge et plus particulièrement à travers l'exemple du carnosol provenant d'un extrait de romarin.

Ainsi, une méthode de purification de cette molécule d'intérêt a dans un premier temps pu être mise en place sur un appareil CPC de petit volume, dans le but de réaliser des développements de méthodes de manière rapide, tout en consommant peu d'échantillon, de solvants et rejetant donc moins de déchets. Cette méthode a permis d'isoler une quantité égale à 1 mg de carnosol à l'aide d'un rotor de 35 mL, avec un taux de récupération et une pureté proches de 100%. Ces travaux ont également été l'occasion de montrer quels étaient les outils permettant de réaliser un développement de méthode en CPC, à travers le choix et la construction du système solvant approprié, le choix des conditions opératoires initiales en CPC, le test de séparation en conditions réelles et la collecte des solutés en sortie de colonne afin d'en déterminer leur pureté à l'aide de méthodes d'analyses telles que l'HPLC.

En second lieu, nous avons pu mettre en place une nouvelle méthodologie de changement d'échelle en CPC, permettant le transfert d'une méthode de purification d'un petit rotor à un rotor de plus grand volume. L'utilisation d'une telle méthodologie comporte l'avantage de pouvoir augmenter de manière efficace la productivité d'une méthode de purification, permettant ainsi de réduire la consommation d'échantillon, de solvants, d'énergie et la production de déchets chimiques. Contrairement aux systèmes hydrodynamiques, le changement d'échelle en système hydrostatique s'avère complexe, du fait de la fréquente variation de design, de volume et du nombre de cellules entre les rotors de CPC. La méthodologie développée au sein du laboratoire, basée sur l'observation expérimentale du comportement de chaque rotor, permet de choisir les conditions opératoires indépendamment d'un instrument à l'autre. Après avoir réalisé le développement d'une méthode de purification sur un rotor analytique et déterminé l'espace disponible entre le pic du soluté à purifier et les impuretés environnantes, une étude de charge est réalisée sur le même appareil afin de déterminer la quantité maximale injectable en fonction du cahier des charges de l'utilisateur. La seconde étape de la méthodologie est réalisée sur le rotor semi-préparatif ou préparatif sur lequel la méthode doit être transférée. Tout d'abord, à travers la réalisation de quelques injections analytiques, il est possible de choisir les conditions opératoires permettant à l'utilisateur CPC de s'approcher au mieux de son objectif de production. Dès lors, par la réalisation d'un calcul simple, ce dernier peut définir la quantité maximale injectable sur le rotor de grand volume, en se basant sur les injections analytiques des deux rotors étudiés et la quantité maximale injectable sur petit rotor. Cette opération permet d'isoler le soluté d'intérêt à échelle préparative, avec la même pureté que sur le rotor analytique. Après la mise en place de la preuve de concept sur des solutés tests, la méthodologie de changement d'échelle a pu être mise à l'épreuve et validée avec succès sur un mélange concret et complexe : la purification du carnosol issu d'un extrait de romarin. Il a ainsi été possible de produire sur un rotor préparatif 23 fois plus grand que le rotor analytique, jusqu'à 45 mg de carnosol purifié sur une opération, soit une quantité 32 fois plus importante, et de travailler jusqu'à une productivité optimale de 50 mg de carnosol/h soit une productivité 16 fois plus grande en consommant seulement 10 fois plus de solvants.

La dernière partie de ce manuscrit est consacrée à la substitution de solvants dangereux pour l'homme et l'environnement par des solvants verts, souvent d'origine agro-sourcée. Les différentes études comparatives réalisées ont permis de montrer qu'il était possible de remplacer l'heptane, un solvant

d'origine pétrolière, par du limonène, issu de déchets de l'industrie agroalimentaire. Dès lors, en se basant sur le système solvant Arizona classique, composé d'heptane, d'acétate d'éthyle, de méthanol et d'eau, nous avons pu mettre en place un nouveau système solvant appelé Arizona vert, composé de limonène, d'acétate d'éthyle, d'éthanol et d'eau, tous issus de la liste des solvants verts réalisée par Aubry. La comparaison des deux types de systèmes solvants n'a mis en évidence que de très faibles divergences en termes de polarité. La différence de densité entre les phases supérieures et inférieures apparaît quant à elle beaucoup plus faible sur le système Arizona vert, ne permettant une utilisation de la gamme complète du système solvant que sur système hydrostatique (CPC). La suite de l'étude a consisté à substituer les solvants utilisés pour la purification du carnosol par le système solvant Arizona vert en remplaçant l'heptane par du limonène et le MTBE par de l'acétate d'éthyle, dont la polarité est similaire. Les résultats de la séparation par CPC ont permis d'isoler de manière pure la molécule de carnosol à l'aide de ce nouveau système solvant, avec un taux de récupération légèrement inférieur aux résultats obtenus précédemment. Le possible emploi de ce système solvant vert apparaît donc très encourageant, puisqu'il semble qu'une légère modification des proportions utilisées devrait suffire à améliorer le taux de récupération.

Les études présentées dans ce travail permettent d'envisager plusieurs perspectives :

- (1) Tout d'abord, la méthodologie de changement d'échelle en CPC mise en place au laboratoire n'a pour l'instant été validée qu'en mode élution. Il serait intéressant de rechercher comment l'appliquer sur d'autres modes d'utilisation des appareils de CPC tels que le pH-zone refinig ou en mode élution-extrusion.
- (2) Ensuite, la chromatographie de partage centrifuge étant une technique préparative, nous avons pu voir qu'il y avait un intérêt certain à réaliser une optimisation des conditions opératoires afin de pouvoir atteindre un objectif de production (productivité maximale, charge maximale par opération, etc.). Ces conditions opératoires optimales ne peuvent actuellement être déterminées qu'expérimentalement, ce qui oblige l'utilisateur à injecter une petite quantité d'échantillon et donc utiliser une certaine quantité de solvants. Il serait ainsi très intéressant de pouvoir prédire les conditions opératoires optimales en fonction du type de rotor et du système solvant afin de réduire au maximum le nombre d'injections.
- (3) Enfin, d'autres études de substitution de solvants pourraient également être menées afin de pouvoir donner aux utilisateurs CPC l'opportunité d'employer systématiquement des solvants peu dangereux voire inoffensifs, en privilégiant par exemple l'utilisation d'eau ou de solvants d'origine bio-sourcée.

TITRE en français : Eco-purification de produits naturels par CPC : changement d'échelle et solvants alternatifs

RESUME en français :

L'objectif de cette thèse est de mettre en place des outils permettant l'éco-purification de produits naturels par chromatographie de partage centrifuge (CPC), une technique préparative permettant la séparation de composés grâce à un système solvant constitué de deux liquides non miscibles.

Ce manuscrit expose dans un premier temps une brève présentation des différentes techniques préparatives fréquemment utilisées pour la purification de produits naturels, puis détaille la technique de chromatographie de partage centrifuge. Le concept de chimie verte est alors introduit avant d'exposer la manière dont il sera pris en compte par la suite. Ainsi, un développement de méthode CPC à petite échelle, dans le but de limiter la consommation de solvants et la production de déchets, tout en limitant la consommation d'énergie, est illustré par la purification du carnosol issu du romarin. Par la suite, une nouvelle méthodologie de changement d'échelle en CPC est introduite, afin de pouvoir augmenter de manière efficace la productivité d'une méthode de purification, sans avoir à la redévelopper à grande échelle. L'utilisation de cette méthodologie peut notamment permettre à un utilisateur CPC de réduire considérablement sa consommation de solvants et d'énergie, tout comme sa génération de déchets chimiques. Cette méthodologie de changement d'échelle est appliquée dans le cadre de la purification du carnosol développée en amont. Enfin, la dernière partie de ces travaux est consacrée à la substitution de solvants d'origine pétrolière, par des solvants plus respectueux de l'environnement, principalement d'origine agro-sourcée.

TITRE en anglais : Natural products eco-purification by CPC : scale-up and alternative solvents

RESUME en anglais :

The main objective of this thesis is to propose some clues for natural products eco-purification by centrifugal partition chromatography (CPC), a preparative separation technique that uses a biphasic solvent system.

First, the manuscript describes the different preparative techniques commonly used for natural products purification. Then, the centrifugal partition chromatography technique is detailed. The green chemistry concept is subsequently introduced and discussed in regard to its application in purification process. A method development is realized on a small scale CPC, illustrating the reduction of solvent consumption and waste production, through the carnosol purification from rosemary. Later, a new scale-up methodology for CPC is introduced to efficiently transfer the method on larger instrument and increase production. This new methodology will allow for a CPC user to reduce solvent and energy consumption and chemical wastes discharges. This scale-up methodology is then applied to carnosol purification from a rosemary solid extract. Finally, the last part of this manuscript is devoted to petroleum solvents substitution by more environmentally friendly solvents like bio-sourced solvents.

DISCIPLINE : Chimie Analytique

MOTS-CLES : Chromatographie de partage centrifuge, purification, chimie verte, changement d'échelle, produits naturels, solvants alternatifs, carnosol.

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

Institut des Sciences Analytiques, Université de Lyon, UMR CNRS 5280, 5 rue de la Doua, 69100 Villeurbanne, France.